



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Desarrollo de métodos para la selección de mutantes de la inulosacarasa IslA4”

TESIS:

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

ROBERTO ICKEN HERNÁNDEZ LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Agustín López Munguía Canales**
VOCAL: **Profesor: María del Carmen Wachter Rodarte**
SECRETARIO: **Profesor: Arturo Navarro Ocaña**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Maricarmen Quirasco Baruch**
2° SUPLENTE: **Profesor: Sandra Paola Sánchez Rodríguez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Éste trabajo se realizó en el **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología – UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Agustín López-Munguía Canales

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. María Elena Rodríguez Alegría

SUSTENTANTE (S):

Roberto Icken Hernández López

“Por mi Raza hablará el Espíritu”

José Vasconcelos

“Vivid en la serena paz de los laboratorios y de las bibliotecas.

Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme?

Y después, a medida que vayáis progresando:

¿Qué he hecho por mi patria?

Hasta que llegue el día en que podáis tener la íntima satisfacción de pensar en que habéis contribuido de alguna manera al progreso y al bienestar de la humanidad”

Louis Pasteur

“La inversión en el conocimiento debe ser un fermento de nuestra identidad cultural”

Agustín López Munguía Canales

“Es bueno padecer aunque sea un poquito esta parranda que es la vida”...

Rolando Rosas Galicia

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a la gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México, por darme formación, educación y valores.

Gracias por poner en mi camino a personas maravillosas, por abrazarme en tu impresionante Ciudad Universitaria y darme los momentos más felices de mi juventud. Siempre estaré agradecido y comprometido por ti, Universidad.

A la Facultad de Química, por formarme integralmente como profesionista comprometido con el bien de la sociedad mexicana y el desarrollo sustentable del país.

A mis Profesores, por todas sus enseñanzas, por sus exigencias para formarme como una persona comprometida con el progreso de la sociedad y el medio ambiente. Quiero hacer una mención especial a los profesores: Dr. Eduardo Bárzana García, F. y M. Julio Martín Espinosa Casares, Q.F.B. Rodolfo Fonseca Larios, Dr. Héctor García Ortega, Q.F.B. Martha Giles Gómez, Dra. Liliana González Osnaya, Dr. Octavio Paredes López, M. Tonatihu Valdez Hernández.

† Al I.Q. Federico Galdeano Bienzobas por aquellas pláticas que me guiaron en el final de ésta etapa y el porvenir.

A la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte por la revisión y apoyo en la realización de éste trabajo.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por la revisión de éste trabajo.

Instituto de Biotecnología, UNAM

Agradezco al Dr. Agustín López Munguía Canales, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por sus grandes enseñanzas y valioso apoyo. Gracias por ser un auténtico ejemplo a seguir.

A la M. en C. María Elena Rodríguez Alegría por su apoyo incondicional, comprensión y compromiso para la realización de éste trabajo. Gracias por tu sinceridad y amistad.

Al Dr. Humberto Flores Soto por su gran apoyo y paciencia en la parte experimental de éste trabajo.

A la Dra. Gloria Saab Rincón por las aportaciones realizadas.

A la T.L. Aurelia Ocampo Vargas por su valioso apoyo en el trabajo de laboratorio.

A mis amigos de laboratorio por hacer divertida mi estancia en el Instituto.

Agradecimientos

Al I.Q. Armando López Ríos por apoyarme en todo momento académica y personalmente. Gracias por ser mi tío, mi padrino mi amigo.

Al Profesor Zaprian Petrov Doychev por ser mi entrenador, mi maestro, mi ídolo y el mejor ejemplo de lo que significa ser un luchador dentro y fuera del colchón.

A mi entrenador y gran amigo José Jiménez Meléndez por todas sus enseñanzas, por inculcarme los verdaderos valores deportivos y forjar mi carácter a través de nuestro amado deporte, “Lucha Olímpica”.

A la Q.A. Jazmín Pineda Alcántar por permitirme soñar despierto, compartir un sinfín de experiencias maravillosas y ser mi gran apoyo, gracias.

A mis amigos, porque son quien complementan mi ser, por todas las aventuras y alegrías compartidas, por estar ahí en todo momento escuchando, comprendiendo, apoyando. Porque un amigo es para siempre, porque hemos compartido nuestra juventud y compartiremos nuestro porvenir.

Dedicatoria

A mi mamá Elsa López Ríos y a mi papá Rafael Hernández Aldama:

Por darme vida.

Me han heredado lo más valioso: Educación.

Con su ejemplo y apoyo incondicional soy lo que ustedes han construido, mis logros siempre serán sus logros, ¡Sigamos luchando!

A mis hermanos Elsy y Hegel:

Por ser parte fundamental en mi vida

A toda mi familia

Índice	
Portada	
Abreviaturas	v
Resumen	vi
Introducción	1
1.0 Antecedentes	4
1.1 Fructanas: estructura y función	4
1.2 Fructooligosacáridos e inulina: definición, características y funciones	6
1.3 Alimentos funcionales	9
1.4 Microbiota intestinal	10
1.5 Fructosiltransferasas	14
1.6 Glucosiltransferasas	15
1.7 La inulosacarasa IsIA: una fructosiltransferasa de <i>Leuconostoc citreum</i>	16
2.0 Evolución molecular	20
2.1 Diseño de enzimas por evolución molecular	20
2.1.1 Mutagénesis sitio-dirigida	22
2.1.2 Evolución dirigida o mutagénesis al azar	23
2.1.3 Estrategias de screening	27
2.1.4 Alternativas en la búsqueda de mutantes de IsIA4 con mayor actividad	29
3.0 Hipótesis	33
4.0 Objetivo	33
4.1 Objetivos específicos	33
5.0 Materiales y métodos	34

5.1 Material biológico	34
5.2.0 Medios de cultivo	35
5.2.1 Medio Luria Bertani	35
5.2.2 Medio mínimo M9	35
5.2.3 Sales M9 (10X)	35
5.3.0 Soluciones	36
5.3.1 Reactivo DNS	36
5.3.2 TAE 1X	36
5.3.3 Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH6	36
5.3.4 Solución de CaCl₂ 100 mM	36
5.3.5 Glicerol 80%	36
5.4 Kits de Biología Molecular	37
5.5 Enzimas utilizadas	37
5.6 Antibióticos	37
5.7 Equipos	37
5.8.0 Producción inulosacarasa IsIA4	38
5.8.1 Determinación de actividad enzimática	38
5.9.0 Técnicas de biología molecular	40
5.9.1 Purificación de ADN	40
5.9.2 ADN proveniente de PCR y de digestiones con enzimas de restricción	40
5.9.3 ADN proveniente de reacciones de ligación	41
5.9.4 Electroforesis de ADN	41
5.9.5 Secuenciación	41
5.9.6 Análisis de las secuencias de ADN	42
5.9.7 Obtención de células competentes	42
5.9.8 Protocolo I para preparar células de <i>E. coli</i> electro competentes	42

5.9.9 Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	43
5.9.9.1 Protocolo II Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	44
5.9.9.2 Obtención del material genético de librerías mutagénicas	44
5.9.9.3 Construcción de librerías mutagénicas empleando PCR <i>error-prone</i>	44
5.9.9.4 Análisis de las librerías mutagénicas	48
6.0 Resultados y análisis	49
6.1 Primera parte	
Método de selección mediante el ensayo directo de la actividad enzimática	49
6.1.1 Adaptación de las condiciones del método DNS para la medición de azúcares reductores en condiciones de baja temperatura	49
6.1.2 Determinación de actividad enzimática de IsIA4 por el método de DNS en condiciones de baja temperatura	53
6.1.3 Conclusiones sobre la viabilidad de un ensayo de azúcares reductores en condiciones de baja temperatura	63
6.2 Segunda parte Selección de mutantes mediante el fenotipo derivado de la síntesis de polímero	64
6.2.1 Selección de cepas	64
6.2.2 Construcción de librerías mutagénicas	68
6.2.2.1 PCR <i>error prone</i>	68
6.2.3 Secuenciación de librerías mutagénicas	71
6.2.4 "Screening" de librerías mutagénicas	71

7.0 Conclusiones	75
8.0 Perspectivas	76
9.0 Referencias	77
9.1 Referencias cepas	86
9.0 Anexo A	87

Abreviaturas

Aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BALs	Bacterias ácido lácticas
CBT	Condiciones a baja temperatura para medición de actividad enzimática a 45°C
CE	Condiciones estándar de medición de actividad enzimática, método Miller, (1959)
DNS	Ácido 3,5- dinitrosalicílico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FOS	Fructooligosacáridos
FTF	Fructosiltransferasas
IS	Inulosacarasa
LS	Levansacarasa
p.b.	Pares de bases
PM	Peso molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

Resumen

Se establecieron dos estrategias de screening para la selección de clonas de *E.coli* conteniendo mutantes con alta actividad de la inulosacarasa IsIA4 de *Leuconostoc citreum*, aislada del pozol y productora de polímero de inulina. La primera se basa en la cuantificación de azúcares reductores (Miller, 1959) en condiciones de adecuadas para su automatización. Se realizaron adaptaciones en las condiciones de reacción (tiempo y temperatura) para dicho método, con el fin de adaptarlo a un sistema –robot- que tiene la capacidad de leer miles de muestras en poco tiempo pero con la limitante de no poder trabajar a temperaturas mayores de 50 °C. La segunda estrategia de screening desarrollada es cualitativa y se basa en la selección de mutantes de acuerdo a su fenotipo, en particular un fenotipo mucoso de las mutantes generadas, debido a la mayor actividad transferasa de la inulosacarasa IsIA4.

Se realizaron estudios para la obtención de mutantes de la IsIA4 mediante técnicas de evolución dirigida, estableciendo las condiciones para generar librerías mutagénicas por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR *error-prone*), donde debido a la generación de gran diversidad genética se espera encontrar mutantes con mayor actividad catalítica.

Introducción

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo glicosilo de una molécula donadora hacia una receptora. Entre estas enzimas se encuentran las fructosiltransferasas (FTFs), enzimas que transfieren un residuo de fructosa de la sacarosa primeramente hacia la sacarosa, y posteriormente hacia la cadena de fructosas que se genera hasta dar lugar a un polímero denominado fructana. Las fructanas pueden ser de tipo inulina o tipo levana. La primera es un polímero con enlaces β (2 \rightarrow 1) en la cadena principal y β (2 \rightarrow 6) en la ramificada. Por el contrario, la levana presenta enlaces β (2 \rightarrow 6) en la cadena principal y ramificaciones β (2 \rightarrow 1) aproximadamente cada 9 o 10 residuos. Cuando las cadenas de fructosa presentan un grado de polimerización (GP) de 2 a 10 unidades reciben el nombre de fructooligosacáridos (FOS) los cuales tienen propiedades prebióticas por lo que son utilizados a nivel industrial como aditivos en la formulación diversos alimentos.

Las fructanas son sintetizadas por plantas, hongos y bacterias. En el caso específico de la inulina microbiana, esta puede ser sintetizada por FTFs multidominio provenientes de bacterias gram positivas de géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, entre otros.

Hace algunos años en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología Enzimática del IBT-UNAM, (Olivares-Illana *et al.* 2003) realizaron investigaciones con la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum*, de la cual aislaron una enzima FTF con capacidad de producir inulina, es decir, una inulosacarasa a la que se denominó IslA. El análisis de su estructura primaria indicó que es una FTF con regiones adicionales con alta similitud a la alternansacarasa (ASR), una glicosiltransferasa (GTF) presente en *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Las GTFs son enzimas que catalizan reacciones análogas a las FTFs pero transfiriendo glucosa a partir de sacarosa y formando polímeros de glucosa.

Con la finalidad de conocer el posible papel de los dominios adicionales del tipo GTF en la función de IslA, (Del Moral *et al.* 2008), construyeron tres versiones

truncadas de la IsIA: IsIA2, IsIA3 e IsIA4 concluyéndose que la región C-terminal con alta identidad con ASR no está involucrada con la estabilidad, pero sí con la especificidad de reacción ya que las versiones truncadas se vuelven más hidrolíticas. Posteriormente, Rodríguez *et al.* (2010), construyeron diversas mutantes de la versión IsIA4 de la enzima inulosacarasa IsIA de *L. citreum*, la cual únicamente tiene el dominio catalítico y un fragmento de 101 aminoácidos en el amino terminal. Para mutagenizar la IsIA4 se consideraron los mismos criterios empleados que para la levansacarasa de *B. subtilis* (Ortiz *et al.* 2008). De éste estudio destaca la mutante S425A ya que modifica la especificidad de reacción de transferencia preferentemente hacia la síntesis de FOS con la ventaja adicional de no producir polímero (inulina); sin embargo, la constante catalítica (k_{cat}) disminuyó casi 50 veces comparada con la k_{cat} de la enzima silvestre. Este hallazgo podría ser de relevancia debido a los múltiples beneficios y aplicaciones de los FOS. Sin embargo a pesar de las características interesantes de esta mutante, su aplicación potencial en la síntesis de FOS se ve limitada por su baja eficiencia catalítica y baja estabilidad.

Con el objetivo de incrementar los rendimientos de FOS, se plantea realizar estudios mutagénicos de evolución dirigida, los cuales se basan en la generación de miles de mutantes dentro de las que se espera generar nuevas enzimas con muy diversas propiedades, incluidas mutantes con mayor eficiencia catalítica. Sin embargo un punto crítico y limitante para la obtención de mutantes con las características deseadas (en este caso sobre-productoras de inulina y/o FOS) es el método de selección o screening que logre diferenciar alguna mutante con dichas características dentro de las miles generadas, ya que no existe hasta la fecha un método disponible para tal fin. Ante esta perspectiva se plantea desarrollar dos métodos de selección: el primero cuantitativo midiendo el cambio de actividad acoplado a un instrumento automatizado –robot- que permita analizar miles de mutantes mediante ensayos en placa, y el segundo, un método de selección basado en el fenotipo mucoide que la inulosacarasa IsIA4 confiere a

E.coli, partiendo de la hipótesis de que una enzima mutante más activa para la síntesis de polímero, resultará en una cepa con un fenotipo mucoide más intenso. La selección de enzimas sobre-productoras a partir de cepas mucoides es un método visual cualitativo que permite seleccionar más rápidamente a las posibles clonas productoras.

1.0 Antecedentes

1.1 Fructanas: estructura y función

Las fructanas son polímeros compuestos por unidades de fructosa, que cuando están unidas mediante enlaces tipo β (2-1) se conocen de manera general como inulinas y cuando lo están mediante enlaces tipo β (2-6) se conocen como levanas. La solubilidad de las fructanas en agua fría es variable, pero en general son muy solubles en agua caliente e insolubles en alcohol etílico. Las fructanas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza ya que se encuentran presentes en algunos géneros de bacterias, hongos, algas y en una gran diversidad de plantas Hendry (1993), donde cumplen diferentes funciones.

La síntesis de fructanas ha sido ampliamente reportada en bacterias Gram-positivas, entre ellas las ácido lácticas *Leuconostoc mesenteroides* Lewis *et al.* (1967), *Lactobacillus reuteri* Van *et al.* (1999), y *Streptococcus mutans* Corrigan y Robyt (1979), así como en algunas especies del género *Bacillus* Tanaka y Yamamoto (1980). De igual forma están presentes en bacterias Gram-negativas como *Zymomonas mobilis* Doelle *et al.* (1993), *Gluconacetobacter diazotrophicus* Hernández *et al.* (1995) y algunas especies del género *Pseudomonas* Osman *et al.* (1986).

En hongos hay evidencia de la síntesis de fructanas de tipo inulina en especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, en algunas de las cuales se han encontrado fructanas de bajo peso molecular (fructooligosacáridos), como en el caso de *Aspergillus niger*, Hendry (1993). A pesar de que existen abundantes reportes relacionados con enzimas fungales que producen fructanas aún no se conoce cuál es su función fisiológica en estos organismos.

En el caso de las plantas, las fructanas están presentes en aproximadamente el 15% de las plantas que producen flores, es decir, alrededor de unas 40,000 especies, Hendry (1993). Entre las plantas que acumulan fructanas hay muchos

cultivos de interés agroindustrial como cereales (trigo, avena, cebada), hortalizas (achicoria, cebolla, lechuga), así como el agave. Las fructanas de origen vegetal tienen un peso molecular mucho menor que las fructanas bacterianas, ya que alcanzan un máximo de 200 unidades de fructosa. Al igual que el almidón, las fructanas sirven como reserva de carbohidratos (Vijn y Smeekens, 1999). Por otro lado, las plantas que sintetizan fructanas tienen mayor resistencia a varios tipos de estrés como sequía, frío y salinidad, mediante el control de presión osmótica dentro de la célula. Ensayos de interacción entre monocapas lipídicas e inulina de achicoria y dalia, sugieren que las fructanas intervienen en el control de la presión osmótica dentro de la célula. Según Hinch *et al.* (2000) probablemente debido a esta propiedad, las fructanas juegan un papel importante en la estabilización de las membranas durante el congelamiento y la desecación. Se cree que las fructanas protegen la bicapa lipídica y de esta forma previenen el daño a las membranas celulares, sin embargo aun no se conoce el mecanismo molecular por el cual se incrementa la resistencia a estos factores.

Como hemos descrito, existen 2 tipos principales de fructanas que se distinguen por la naturaleza del enlace que une a las fructosas, resultado de la especificidad de las enzimas involucradas en su síntesis: la inulina es un polímero lineal de fructosa con enlaces β (2-1) en la cadena principal y β (2-6) en las ramificaciones, mientras que la levana presenta enlaces β (2-6) en la cadena principal y β (2-1) en las ramificaciones (tabla 1).

Las fructanas y principalmente los fructooligosacáridos (FOS, cadenas de fructosa con grado de polimerización (GP) menor a 10), son considerados como nutracéuticos. Los nutracéuticos son componentes de alimentos que además de nutrir al cuerpo desempeñan una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, favoreciendo la salud y/o previniendo enfermedades. En este sentido las fructanas se han caracterizado por su función prebiótica, favoreciendo el desarrollo de una microbiota adecuada para los seres humanos

siendo actualmente el componente más importante de los alimentos funcionales (Del Moral *et al.* 2008).

Tabla 1. Clasificación de las fructosiltransferasas.

Fructosiltransferasa	Polímero	Enlaces
Inulosacarasa (IS)	Inulina	β 2-1 y ramificaciones en β 2-6
Levansacarasa (LS)	Levana	β 2-6 y ramificaciones β 2-1
Fructosiltransferasas de plantas	fructanas mixtas	β 2-1 y β 2-6

1.2 Fructooligosacáridos e inulina: definición, características y funciones

Los FOS son de gran interés ya que presentan excelentes propiedades biológicas y funcionales para su uso como componentes prebióticos, ya que son ingredientes alimenticios no digeribles (debido a su enlace tipo β), que tienen efectos benéficos en el hospedero, estimulando el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias en el colon promoviendo la salud del hospedero (Roberfroid y Slavin 2000; Gibson y Roberfroid 1995). Son usados como componentes de alimentos funcionales y reciben estatus de alimentos GRAS por la FDA. Presentan varias propiedades que los hacen un prototipo ideal de prebióticos ya que además de estimular el crecimiento de bifidobacterias, son sustancias de bajo valor calórico, azúcares no cariogénicos, que se ha reportado contribuyen a la prevención del cáncer de colon, a reducir los niveles de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos en suero (Katapodis *et al.* 2004; Moore *et al.* 2003).

Se ha demostrado que algunos efectos de la inulina y los FOS sobre la microbiota intestinal humana incluyen la estimulación del crecimiento de la microbiota benéfica, que incluye bacterias tales como bifidobacterias, lactobacilos, *Clostridium coccoides* y *Eubacterium recta* principalmente (figura 1). Los

beneficios a la salud dependen directamente de las funciones de la bacteria, de su interacción con otras bacterias y de la modulación de funciones intestinales, además de los productos finales de la fermentación (Harmsen *et al.* 2002; Guigoz *et al.* 2002).

Los FOS son utilizados también como edulcorantes de bajo índice glucémico en el desarrollo de alimentos funcionales, ya que proporcionan baja dulzura (aproximadamente 1/3 comparada con la sacarosa), bajo aporte energético, son altamente solubles y presentan propiedades tecnológicas estrechamente relacionadas con las del azúcar y las de los jarabes de glucosa, además de que son estables y de fácil manejo. Frecuentemente son utilizados junto con intensificadores de dulzura como aspartame o acesulfame K ya que proveen un sabor sostenido, reducen el resabio amargo, mejoran la estabilidad y ejercen sinergismo del poder edulcorante en estas mezclas Franck (2002).

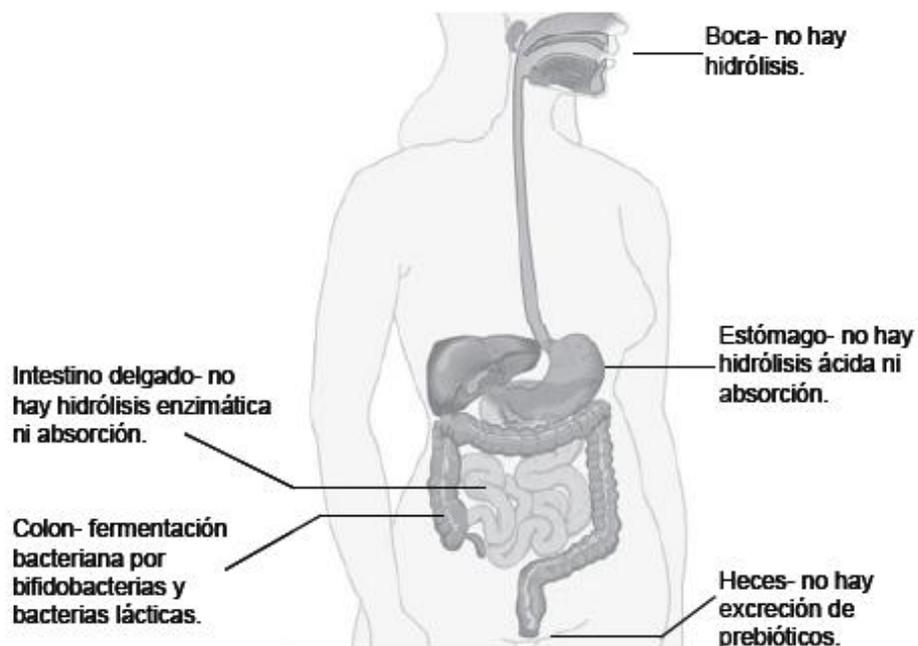


Figura 1. Comportamiento de la inulina y los FOS, como prebióticos, en el tracto gastrointestinal, Kolida *et al.* (2002).

La inulina de achicoria es una mezcla de oligosacáridos y polímeros donde el número de monómeros de fructosa se refieren al grado de polimerización (GP) que varía de 2 a 60 unidades. Sin embargo la principal producción comercial de FOS es mediante transformación enzimática por medio de fructosiltransferasas usando como sustrato sacarosa (Antosová *et al.* 2001; Nishisawa *et al.* 2001; Katapodis *et al.* 2004; Cuervo *et al.* 2004; Sangeetha *et al.* 2005 a) o mediante hidrólisis ácida o enzimática de inulina de achicoria. Una de las principales diferencias de la obtención de inulina por vía enzimática a partir de sacarosa, es que no es necesaria la extracción y destrucción de los vegetales y/o raíces que contienen inulina, además del ahorro en tiempos y costos por medio de estas estrategias biotecnológicas.

La inulina de achicoria es utilizada además como sustituto de grasas, ya que en solución tiene textura similar a la grasa pero con mucho menor valor calórico y proporciona estabilidad a las emulsiones, por lo que es útil en la preparación de postres como helados, jaleas y yogurt, así como productos de panadería (Roberfroid, 2000; Franck, 2002).

Debido a sus funciones y características de los FOS, se han desarrollado métodos para su la extracción y/o síntesis, en la figura 2 se muestran las principales formas de obtención de FOS, A) por *hidrólisis enzimática parcial de la inulina de la planta de achicoria (utilizando una endoinulinasa)* (Franck, 2002) y B) *por síntesis enzimática a partir de sacarosa llevada a cabo con FTF de origen fúngico, principalmente del género de Aspergillus* (Sangeetha *et al.* 2005 a; Yun, 1996).

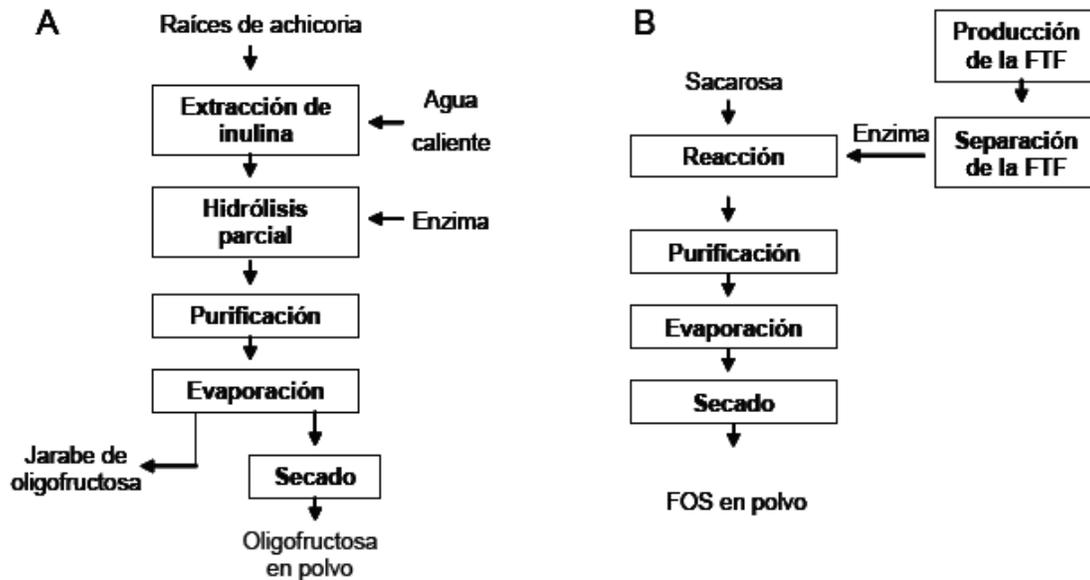


Figura 2. Proceso industrial de producción de FOS.

1.3 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales han sido introducidos como un nuevo concepto de la ciencia y tecnología de alimentos. Según la *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE):

“Un alimento puede considerarse como funcional si se ha demostrado satisfactoriamente uno o más efectos benéficos en el cuerpo, más allá de los efectos de una nutrición adecuada, de manera que mejore la salud y/o el bienestar y reduzca el riesgo de enfermedades. Un alimento funcional debe de seguir siendo un alimento, no debe de ser una píldora o cápsula pero si parte de un patrón alimenticio”. Ésta definición describe todos los objetivos que persigue un alimento funcional en la dieta Roberfroid (2002).

Uno de los objetivos principales de la ciencia de los alimentos funcionales es identificar los componentes alimenticios que tienen la capacidad de modular positivamente las funciones de defensa para ayudar al individuo a fortalecer restaurar o re balancear sus funciones. Los datos experimentales apoyan la

hipótesis de que las fructanas tipo inulina son uno de los principales ingredientes funcionales que se conoce en la actualidad. Se ha demostrado que las fructanas afectan benéficamente las funciones, estructura y composición de las actividades de la mucosa intestinal. También afectan al epitelio, mejorando la morfología de la mucosa, espesamiento y composición de las mucinas. Como consecuencia, se mejora la colonización bacteriana y las funciones tanto químicas como enzimáticas del tracto gastrointestinal (Roberfroid, 2007).

Optimizar la nutrición es un nuevo concepto, que tiene el objetivo de maximizar fisiológicamente las funciones de cada individuo a través de la nutrición, con el fin de garantizar la salud y el bienestar al mismo tiempo que se disminuye el riesgo de enfermedades Milner (2000). En este contexto los alimentos funcionales se han propuesto con un enfoque práctico para mejorar la dieta.

1.4 Microbiota intestinal

La microbiota bacteriana tiene un papel muy importante en la nutrición y bienestar, debido a la gran cantidad de microorganismos que la componen, su fragilidad y su dependencia con la alimentación. A pesar de que se han identificado hasta 500 especies microbianas en el tracto intestinal, la población predominante está constituida por alrededor de 20 géneros *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia* y *Veillonella* (Cummins y Macfarlane, 1991).

La microbiota del colon, fermenta sustancias que no pueden ser digeridas por el hospedero en el tracto superior, como almidones resistentes, carbohidratos no digeribles, oligosacáridos y proteínas. Existen 2 tipos principales de fermentación en el intestino, sacarolítica y proteolítica. La fermentación sacarolítica es favorable para el hospedero por el tipo de productos que se generan. Los principales productos del metabolismo de los microorganismos al actuar sobre los

carbohidratos son ácidos grasos de cadena corta, tales como propionato y butirato. El acetato es metabolizado en los músculos para generar ATP, mientras el propionato es transportado al hígado. El butirato es una importante fuente de energía y tiene propiedades antitumorales. Por otro lado, los productos finales de la fermentación proteolítica, incluyen metabolitos tóxicos como compuestos fenólicos y aminas, que pueden ser carcinogénicos Conway *et al.* (1995). Como resultado, la microbiota intestinal puede ser dividida en benigna, beneficiosa y potencialmente perjudicial.

Según Collins *et al.* (1999) y Gibson (2006), el metabolismo bacteriano puede dar lugar a una serie de ventajas, incluida la producción de vitaminas, la regulación del sistema inmunológico, la digestión, la mejora en la absorción de nutrimentos, la inhibición de las especies nocivas y la eliminación de sustancias cancerígenas y toxinas. Los efectos negativos incluyen la producción de toxinas y carcinógenos, estreñimiento o diarrea, daño al hígado, la predisposición hacia el desorden intestinal, y la putrefacción intestinal. Se sabe que en la microflora existen agentes patógenos que, si se le permite crecer demasiado, pueden interrumpir la función intestinal normal y predisponer hacia el desorden (Macfarlane y Gibson, 1994; Eckburg *et al.* 2005).

En la figura 3 se muestran las características que deben ser consideraras para seleccionar los microorganismos que pudieran poseer propiedades probióticas y con esto garantizar de alguna manera aspectos como la seguridad y funcionalidad del mismo:

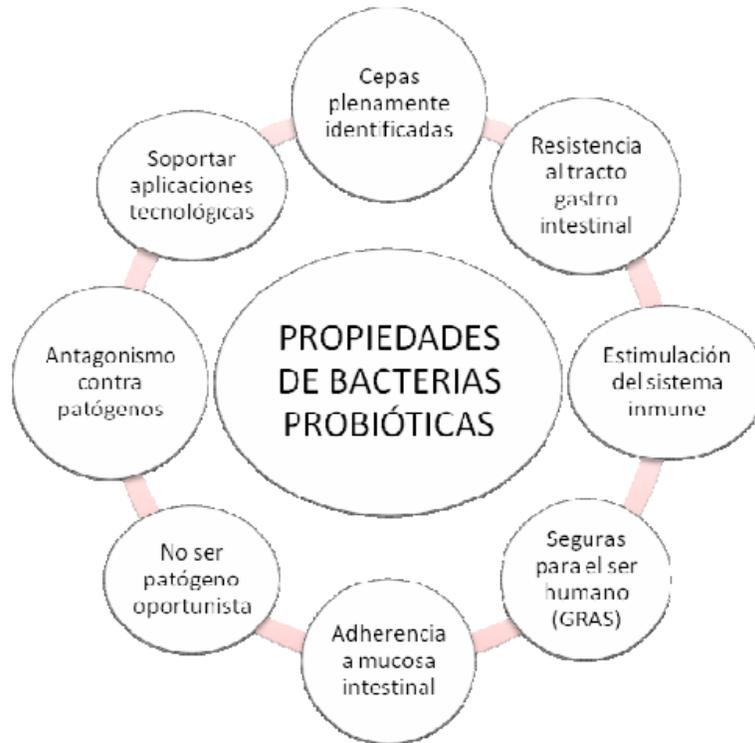


Figura 3. *Propiedades deseables en una bacteria probiótica (Puupponen-Pimiä et al. 2002)*

En el intestino humano se llevan a cabo numerosas reacciones con el alimento, ya sea directamente con las células intestinales o con la microbiota presente, tal es el caso de los carbohidratos que sufren una fermentación dentro del intestino, liberando ácidos grasos de cadena corta a partir de algunos carbohidratos complejos, y dan lugar a metabolitos como agliconas de compuestos fenólicos. Además, constantemente se lleva a cabo un cambio en la microbiota presente y su actividad, lo que deriva en efectos fisiológicos que finalmente ejercen un efecto sobre la salud del hospedero (Puupponen-Pimiä *et al.* 2002) como se esquematiza en la figura 4.

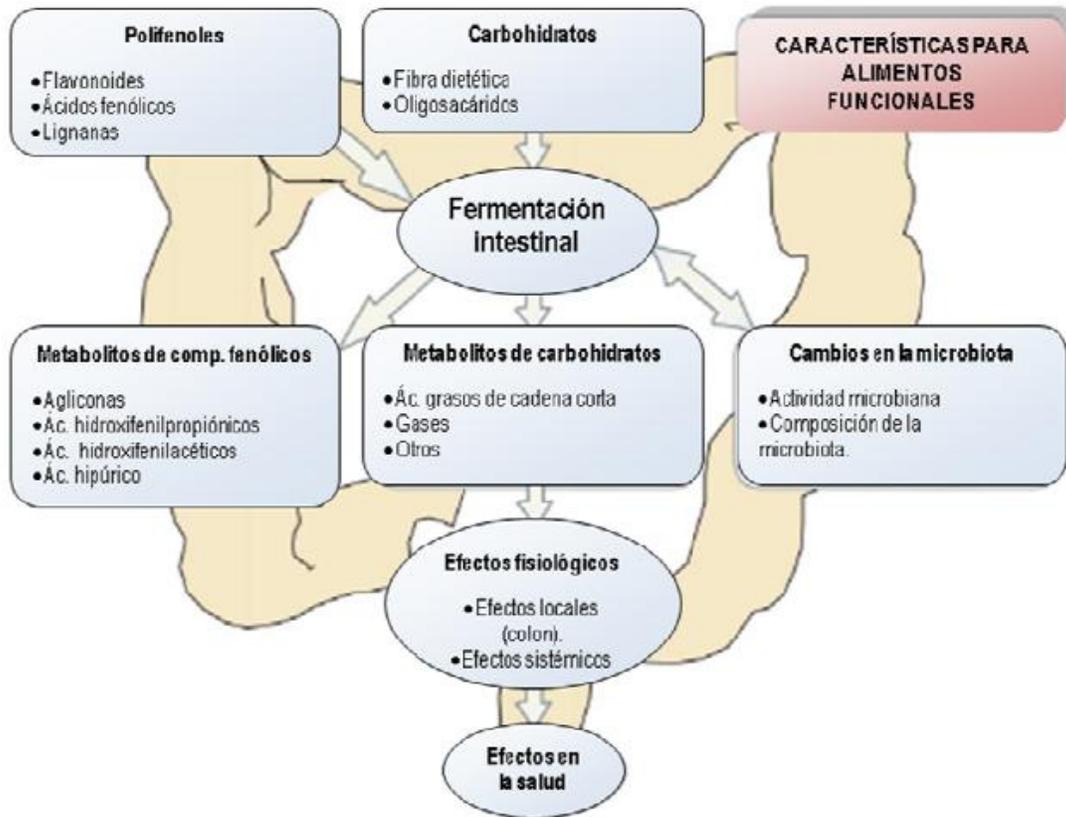


Figura 4. Reacción de varios ingredientes alimenticios con la microbiota del colon con respecto a sus efectos sobre la salud (Puupponen-Pimiä et al. 2002).

El concepto de “colonic health” o “salud del colon” ha surgido como un importante objetivo en el área de desarrollo de alimentos funcionales. Para apoyar la salud, el bienestar y disminuir el riesgo de enfermedades la microbiota debe de estar en “equilibrio”, es decir, debe estar compuesta predominantemente de bacterias potencialmente benéficas como lactobacilos, bifidobacterias, etc., para prevenir, impedir o controlar la proliferación de microorganismos potencialmente patógenos y dañinos como *E. coli*, *Clostridia*, *Veillonellae* o *Candida* (Gibson y Roberfroid, 1995). Los efectos prebióticos de inulina y FOS se han confirmado en diversos estudios *in vivo* e *in vitro* (Sofia et al. 2007).

1.5 Fructosiltransferasas

Las enzimas productoras de FOS son usualmente clasificadas como fructosiltransferasas (FTFs), con alta actividad de transfructosilación. Las fructosiltransferasas (FTFs) poseen únicamente actividad de transfructosilasa cuando actúan sobre sacarosa como sustrato, transfiriendo grupos fructosilo a una molécula aceptora que inicialmente es la sacarosa, pero que conforme avanza la reacción es también el polímero en crecimiento. Cada molécula de sacarosa que es usada como sustrato, da lugar a la liberación de una molécula de glucosa al medio (figura 5). Las FTFs poseen también actividad hidrolítica y de transfructosilación a otros aceptores que se pueden agregar al medio de reacción (Antosavá *et al.* 2001; Cuervo *et al.* 2004).

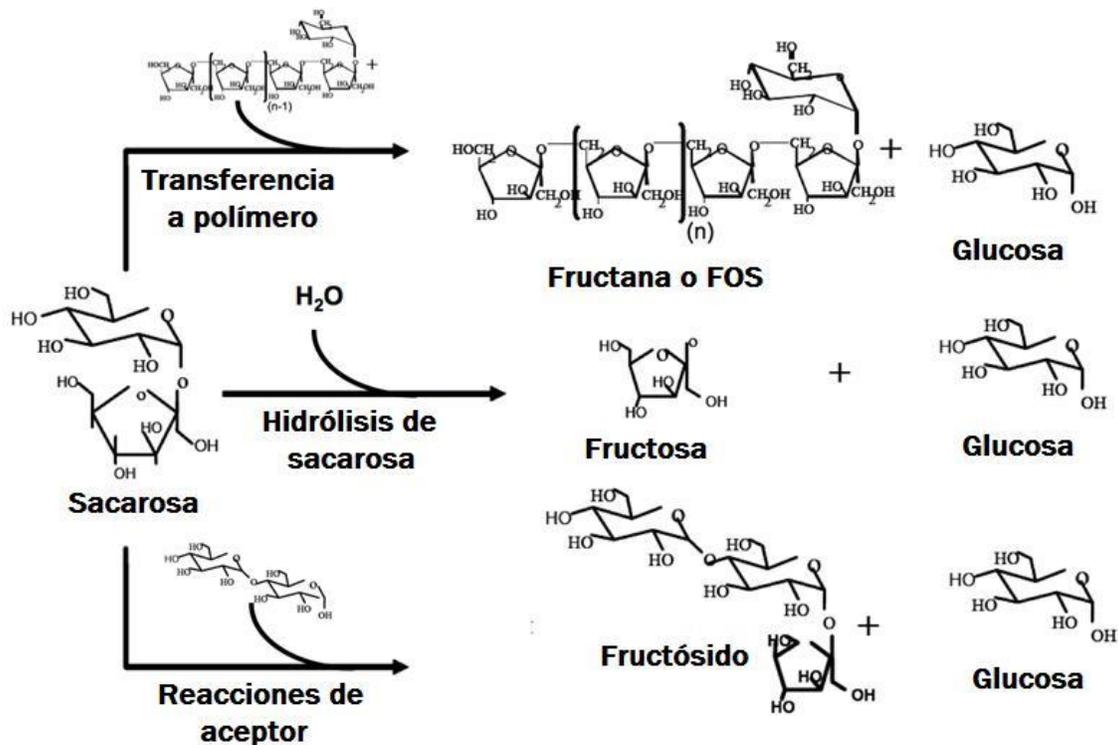


Figura 5. Reacciones catalizadas por las FTF de bacterias. Las FTF bacterianas son capaces de realizar tres reacciones con sacarosa como sustrato: transferencia, hidrólisis y reacción de aceptor, esta última en presencia de una molécula agregada al medio que pueda actuar como nucleófilo. En todas las reacciones se obtiene como producto glucosa libre, que se puede medir por la técnica de azúcares reductores DNS (Del Moral *et al.* 2008).

Leuconostoc es un género de bacterias Gram-positivo que pertenece al grupo de bacterias ácido-lácticas junto con los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Weisella* y *Pediococcus* (Farrow *et al.* 1989) son generalmente cocos de forma ovoide que forman en su mayoría cadenas. *Leuconostoc sp.*, es intrínsecamente resistente a vancomicina y catalasa-negativo (lo que hace la distinción con los estafilococos).

Actualmente, todas las bacterias pertenecientes a estos géneros tienen el estatus de GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros, por sus siglas en inglés: *Generally Recognized As Safe*), ante la FDA de los EUA, lo cual permite su libre uso en la producción de alimentos de consumo humano. Los microorganismos pertenecientes a este género son capaces de producir una amplia gama de enzimas del tipo transferasas (glucosiltransferasas y fructosiltransferasas). Todas las especies dentro de este género son heterofermentativas, es decir, fermentan carbohidratos para producir principalmente ácido láctico y cantidades considerables de ácido acético, alcohol etílico, dióxido de carbono y de manera ocasional, ácido fórmico (Uganda P, 2010).

1.7 La inulosacarasa IslA: una fructosiltransferasa de *Leuconostoc citreum*

La inulosacarasa (IslA) de *L. citreum* es una fructansacarasa capaz de sintetizar inulina de alto peso molecular a partir de sacarosa. Esta enzima fue aislada a partir de la cepa CW 28 en *L. citreum* la que a su vez fue aislada del pozol, una bebida tradicional de origen maya a base de maíz nixtamalizado fermentado. Se sabe que esta enzima pertenece a una nueva familia de FTF'S multi-dominio, ya que exhibe características estructurales de glucansacarasa y fructansacarasa; el gen que codifica ha sido clonado y expresado en *E. coli* (Olivares *et al.* 2003), habiéndose encontrado que posee 3 regiones, una de las cuales es el dominio catalítico, con analogía al dominio catalítico de otras FTFs, una región amino

terminal variable, y una región C terminal a base de unidades repetidas con posible función de unión al polímero (figura 6).

Recapitulando, las FTFs de *Leuconostoc spp.* son quimeras naturales que presentan en la región N-terminal: un péptido señal y región variable las cuales tienen identidad con GTFs y una longitud de cadena de 200 aa aproximadamente. El dominio catalítico presenta identidad con las FTFs, y finalmente en la región C-terminal, se localiza un dominio de unión a glucano (GBD, por sus siglas en inglés).

El GBD de las FTFs de *Leuconostoc spp.* tiene alrededor de 400 aa, encontrándose que en la IsIA éste dominio es de 700 aa, lo que corresponde a un poco más de la mitad de la proteína. Con el fin de explorar cual es la función de las regiones de GTF adquiridas por las FTFs en el laboratorio de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, se construyeron versiones truncadas de IsIA. Se encontró en particular que la versión truncada IsIA4, a diferencia de la enzima silvestre y de las otras versiones, contiene el dominio catalítico y un fragmento de 101 aminoácidos en el amino terminal y produce polímero de inulina y FOS de bajo peso molecular en pequeñas cantidades (Del Moral *et al.* 2008).

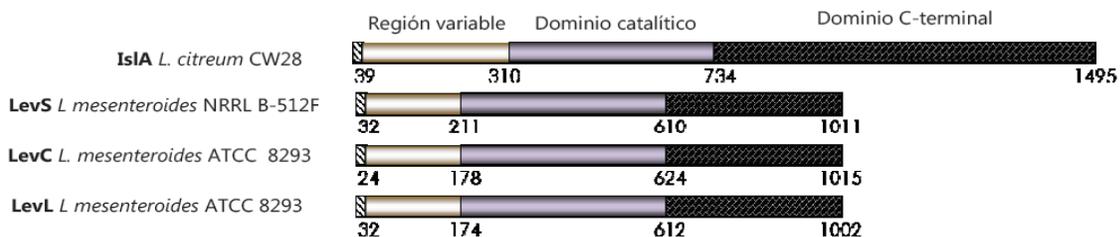


Figura 6. Esquema de la estructura primaria de las FTFs de *Leuconostoc spp.* (Del Moral *et al.* 2008)

Debido a las características estructurales que presenta IsIA de *L. citreum* CW 28, se planteó estudiar la relación estructura-función de la enzima a través de la eliminación total o parcial de dominios y/o regiones adquiridas, dando lugar al

diseño de nuevas versiones truncadas. Para lograr esto se utilizaron las construcciones IslA e IslA2 (Olivares-Illana *et al.* 2003; Pérez *et al.* 2004), además se construyeron otras versiones truncadas: IslA3 a la cual se le eliminó todo el dominio C-terminal, IslA4 a la que se le eliminó de manera parcial el N-terminal (209 aa) y todo el dominio C-terminal, figura 6.1. Además se demostró que tanto IslA3 como IslA4 tienen la capacidad de formar polímero de fructosa (Del Moral *et al.* 2008). Las versiones construidas se esquematizan en la figura 6.1.

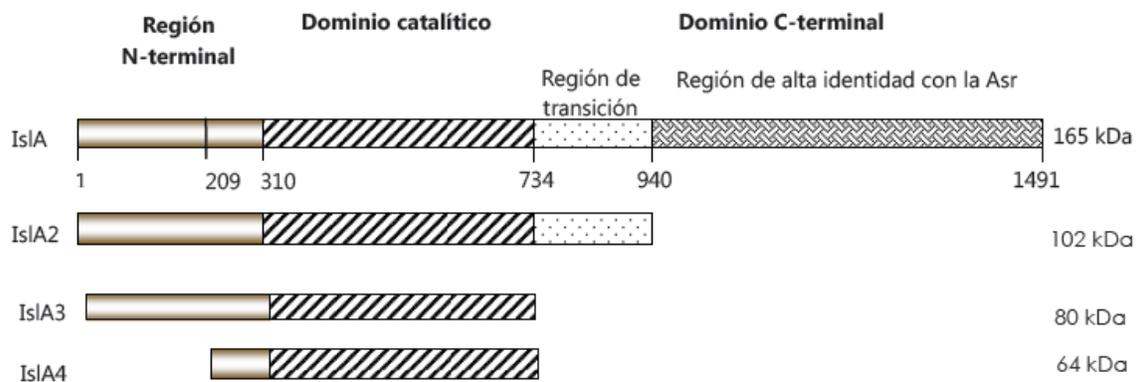


Figura 6.1. Esquema de las versiones truncadas de la inulosacarasa IslA de *L. citreum* CW28 diseñadas y caracterizadas por Del Moral (2008).

Con los estudios realizados por Del Moral *et al.* (2008), se concluyó que la versión IslA3 tiene una relación de hidrólisis transferencia de 61/39, mientras que la versión IslA4 es de 70/30, es decir la versión truncada IslA3 tiene mayor capacidad de transferencia para la producción de polímero de fructosa de alto peso molecular.

Posteriormente, a partir de la versión truncada IslA4, con base en un estudio de relación estructura función, Ortiz *et al.* (2008) diseñaron mutantes con el objetivo de obtener enzimas con la capacidad de sintetizar exclusivamente FOS. Se obtuvo la mutante IslA4-S425A la cual sintetiza una amplia gama de FOS, no produce polímero de alto peso molecular además de presentar mejor estabilidad que la enzima silvestre. Sin embargo resultó mucho menos activa que la silvestre, es decir, su k_{cat} (unidades de actividad enzimática por mol de enzima) disminuyó

drásticamente respecto a la enzima silvestre. La relación (k_{cat}/K_m), que es una medida de la eficiencia catalítica de la enzima (Voet *et al.* 2002) disminuyó considerablemente, mientras que la K_m (inversamente relacionada con la afinidad de la enzima por el sustrato) aumenta. En la tabla 2 se resumen las propiedades cinéticas de la enzima silvestre y la mutante.

Tabla 2. Constantes cinéticas, termo estabilidad y especificidad de las mutantes obtenidas por Ortiz *et al.* (2008).

	K_m (mM)	K_{cat} (s⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM⁻¹s⁻¹)	t_{1/2} (h)	Hidrólisis/Transferencia (%) Relación
IsIA4	82.6	71.0	0.861	2.2	70/30
Silvestre					
IsIA	125	2.3	0.217	3.3	52/48
S425A					

Otro cambio derivado de esta mutación está relacionado con la especificidad de reacción, ya que mientras que la enzima IsIA4 silvestre hidroliza un 70% del sustrato, la mutante aumenta su capacidad de transferasa reduciendo la hidrólisis al 52%. A pesar de las características interesantes de la inulosacarasa en su uso como herramienta industrial, la aplicación potencial de las mutantes en la síntesis de FOS se ve limitada por su baja eficiencia catalítica. Además de las características ya descritas de la mutante IsIA S425A, es importante señalar que presenta una temperatura óptima que se encuentra entre 30-35 °C y decrece rápidamente a 40 °C mientras que el pH óptimo de la enzima es de 6.

2.0 Evolución molecular

2.1.0 Diseño de enzimas por evolución molecular

Las enzimas, en su papel como biocatalizadores, presentan ventajas sustanciales con respecto a los catalizadores químicos tradicionales utilizados a nivel industrial, ya que derivan de fuentes renovables y son biodegradables, presentando por tanto un impacto medioambiental muy reducido, y ofreciendo además, gran selectividad y pureza de productos Cherry *et al.* (2003). Sin embargo, a pesar del elevado atractivo de las enzimas para las aplicaciones biotecnológicas, según Farinas *et al.* (2011), todavía presentan varios inconvenientes, entre ellos se encuentran la lenta catálisis frente a sustratos no-naturales, la baja estabilidad o poca tolerancia a cambios en los parámetros operativos, la poca actividad en medios no acuosos y en algunos casos, el requerimiento de cofactores caros. El reciente progreso en las técnicas de manipulación genética, tecnologías *highthroughput*, genómica y proteómica ha permitido el desarrollo de nuevos biocatalizadores que superan las limitaciones expuestas anteriormente, permitiendo su implementación exitosa en procesos industriales y biotecnológicos.

Un siglo y medio después de que Darwin expusiese su teoría de la evolución, sus ideas no sólo siguen vigentes, sino que han servido de inspiración y modelo para uno de los principales desarrollos biotecnológicos desde el descubrimiento de la ingeniería genética: la aparición de la evolución molecular dirigida. La teoría de la evolución a través de la selección natural propugna la adaptación de los seres vivos al entorno mediante cambios aleatorios minúsculos y heredables de generación en generación (Darwin, 1859). En el laboratorio, se puede simular un particular escenario evolutivo mediante presiones selectivas específicas, recreando los procesos clave de la evolución, (mutación, recombinación y selección) condensando en tiempos muy cortos, los millones de años en que se mueve la escala temporal de la evolución.

En la evolución *in vitro*, se utilizan técnicas de mutagénesis aleatoria inducida y/o recombinaciones del material genético, de manera que, a partir de un gen que codifica para una proteína, se crea una diversidad genética que se expresa en un hospedero. Esta diversidad, representada en una librería de variantes, se explora con tecnologías *high-throughput* bajo las condiciones adecuadas para identificar si alguna de las variantes posee las mejoras de la función o propiedad deseada (Williams *et al.* 2004). De esta manera, sometiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de mutación/recombinación y selección (*screening*), las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta adquirir la propiedad deseada, que se ve mejorada, generación tras generación (Arnold *et al.* 1999) esquematizado en la figura 7.

El principio de la evolución dirigida a nivel molecular fue demostrado por primera vez con ácidos nucleicos (Mills *et al.* 1967), y posteriormente se aplicó para la ingeniería de proteínas (Arnold, 1988). Las técnicas de recombinación o barajado de ADN (*DNA shuffling*) Stemmer (1994), aceleran el proceso evolutivo permitiendo acumular mutaciones benéficas y eliminar las deletéreas, promoviendo el rápido crecimiento de la evolución molecular dirigida. Este conjunto de técnicas no sólo permite crear nuevas proteínas funcionales sino también ensayar características fundamentales de la estructura-función de una proteína.

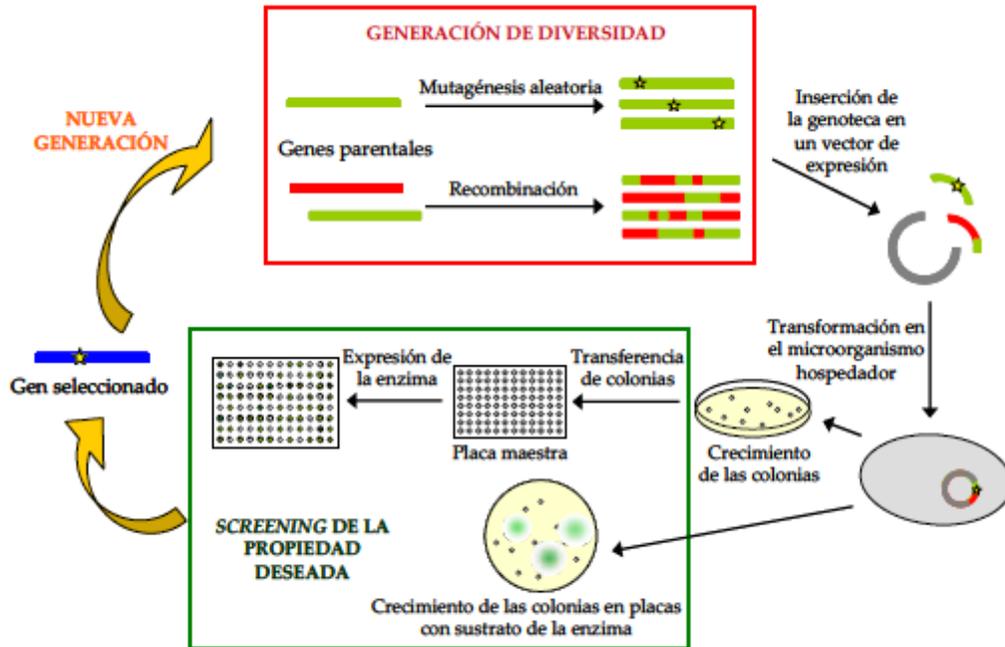


Figura 7. Esquema general de un experimento de Evolución Molecular Dirigida (Cañas, 2009).

La evolución dirigida, como área, tiene dos retos: el primero es la generación de diversidad y el segundo es la selección de mutantes. Las estrategias mutagénicas pueden dividirse en dos principales tipos: mutagénesis sitio-dirigida y mutagénesis al azar o evolución dirigida.

2.1.1 Mutagénesis sitio-dirigida

Durante los últimos años se han desarrollado herramientas computacionales que simulan los procesos de generación de diversidad génica y navegan en las relaciones secuencia-función y estructura-función de las proteínas.

Estas herramientas permiten también identificar sitios en la proteína susceptibles de ser mutados, posibilitando la sustitución por todos los aminoácidos posibles mediante mutagénesis a saturación y la identificación de múltiples mutaciones con efectos sinérgicos (Farinas *et al.* 2001).

La mejora racional de un catalizador requiere numerosos datos y previsiones a nivel estructural, mecanístico y dinámico, así como información funcional para generar enzimas u otras proteínas con nuevas propiedades de interés químico, farmacéutico, biotecnológico o industrial. Mediante este tipo de técnica, se pueden modificar muchas de las propiedades que aportan las características intrínsecas de una proteína. Es posible por ejemplo invertir la enantioselectividad May *et al.* (2000), cambiar la especificidad de sustrato Iffland *et al.* (2000) o modificar la regio especificidad Chen *et al.* (2008). Además, se pueden crear actividades o especificidades nuevas Raillard *et al.* (2001), o aumentar la expresión génica de una determinada proteína en un hospedero Bulter *et al.* (2003).

A pesar del desarrollo de las técnicas de cristalografía de rayos X o espectroscopía de RMN de proteínas, y del aumento del número de secuencias almacenadas en bases de datos públicas, esta información está disponible para pocos catalizadores de interés; además, aún se desconoce cómo la estructura tridimensional de una proteína puede determinar la reacción que va a catalizar. A pesar de décadas de intensa investigación sobre relaciones estructura-función de proteínas, aun nos encontramos lejos de poder diseñar cualquier enzima de forma racional (Arnold *et al.* 1999), necesitando, por tanto estrategias alternativas.

2.1.2 Evolución dirigida o mutagénesis al azar

Durante los últimos años la evolución dirigida se ha convertido en una herramienta poderosa para adaptar las características de proteínas a las necesidades industriales (Yuan *et al.* 2005). La evolución dirigida se inició en 1967 con el trabajo pionero de Spiegelman cuando demostró que se podía reproducir *in vitro* el proceso darwiniano propuesto como hipótesis del mecanismo mediante el cual opera la evolución (Mills *et al.* 1967).

El desarrollo de nuevas herramientas para la obtención de grandes colecciones de variantes y la acumulación de datos detallados sobre la correlación estructural-

función para muchas proteínas ha llevado el aislamiento de enzimas nuevas y mejoradas usando técnicas de “evolución *in vitro*”.

De todas las nuevas metodologías utilizadas para el descubrimiento de enzimas, la evolución dirigida se ha mostrado como la más poderosa, ya que es una forma teóricamente rápida de encontrar variantes enzimáticas que actúan mejor que las que se encuentran de forma natural bajo condiciones específicas (figura 8). La evolución dirigida nos permite explorar funciones enzimáticas jamás requeridas con anterioridad en el ambiente natural. Esta estrategia es utilizada principalmente en enzimas de las cuales no se conoce la estructura molecular (Kuchner y Arnold, 1997; Harris y Craik, 1998; Marrs *et al.* 1999) a diferencia de la evolución sitio-dirigida, donde a partir de la estructura molecular se pueden plantear modificaciones de aminoácidos específicos con el fin de obtener un cambio determinado.

La PCR mutagénica es, quizás, la técnica más utilizada para obtener variabilidad genética (Leung *et al.* 1989; Cadwell y Joyce, 1992). Se trata de una de las estrategias más efectivas para la construcción de bibliotecas, ya que no se requiere información estructural de la proteína, es un método simple, robusto y eficiente que permite el control de los diferentes parámetros de reacción.

El método consiste en introducir errores durante la amplificación del gen de interés. La tasa de error puede incrementarse en múltiples formas. Uno de los métodos más conocidos y empleados es la combinación de pequeñas cantidades de Mn^{2+} así como concentraciones desbalanceadas de nucleótidos trifosfato. Mediante este método las mutaciones se generan por la acción de la ADN polimerasa durante el proceso de amplificación, pudiéndose incrementar la tasa de mutación de múltiples formas. Se ha reportado que altas concentraciones de Mg^{2+} , la presencia de Mn^{2+} (0.1 mM) así como una alta concentración de dGTP y dTTP, (dNTPS desbalanceados) en la reacción de amplificación, conllevan a tasas de error de, aproximadamente un nucleótido por cada Kb (Neylon, 2004). Además, para este tipo de amplificaciones se utilizan polimerasas que carecen de actividad

correctora o que inducen la aparición de mutaciones bajo las condiciones de reacción mencionadas anteriormente (Zhao *et al.* 1999).

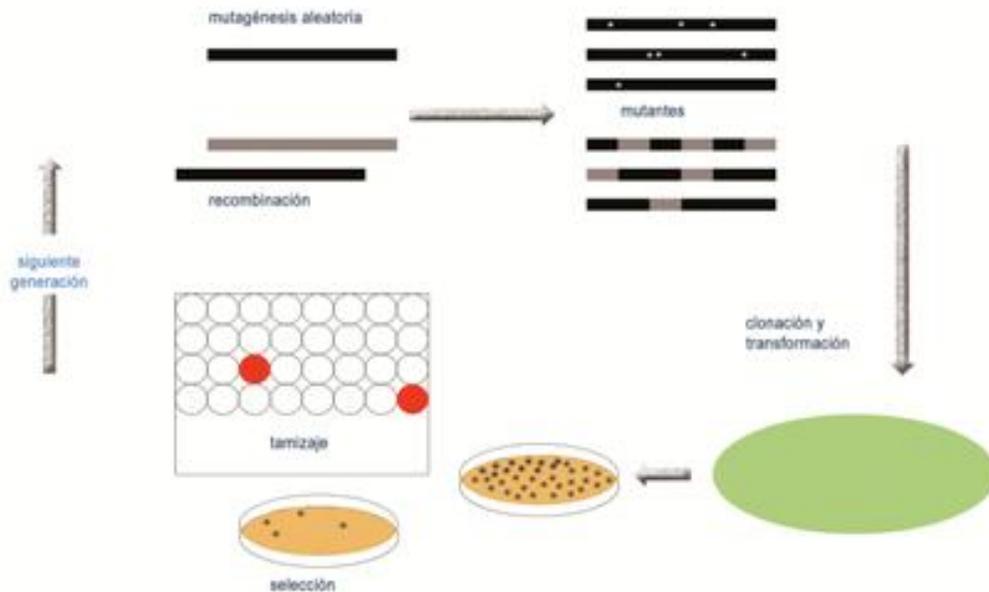


Figura 8. Esquema de la evolución dirigida. Una secuencia puede ser sometida a amplificación por PCR mutagénico o recombinativo. Los productos de estas reacciones son clonados en vectores de expresión y transformados en una cepa bacteriana apropiada, ya sea para selección o expresión. Las clonas son seleccionadas *in vivo* o por tamizaje *in vitro*. Las clonas ganadoras son sometidas a ciclos sucesivos de evolución dirigida hasta obtener el incremento deseado en la función buscada (Stemmer, 1994; Zhao *et al.* 1998).

En principio la introducción de variabilidad acoplado a una selección es, conceptualmente, bastante sencillo. Sin embargo, existen limitaciones que han evitado que se despliegue de manera significativa su tremendo potencial. Estas limitaciones se presentan tanto en la generación de diversidad, como en los métodos de búsqueda y selección. Es decir, uno de los elementos más determinantes y críticos para alcanzar el éxito en un ensayo de evolución dirigida de una enzima es el desarrollo de un método eficiente que permita detectar los mutantes que posean las propiedades catalíticas o de estabilidad deseadas (Zhao *et al.* 1999), de manera general podemos decir que el screening es crucial para el éxito del experimento.

Es importante tener en cuenta que si la tasa de mutación obtenida es demasiado alta, la mayoría de las enzimas obtenidas serán inactivas. Por el contrario, si es demasiado baja la amplificación del gen original tendrá un fondo o “*background*” elevado y se obtendrá muy poca diversidad (Moore y Arnold, 1996). Para obtener una librería adecuada hay que tener en cuenta fundamentalmente dos aspectos: la frecuencia de mutación y el tipo de mutaciones/recombinaciones introducidas. El hecho de que las mutaciones beneficiosas sean muy escasas, ya que la mayoría son deletéreas o neutras, hace que el rango de mutaciones introducidas deba ajustarse cuidadosamente. Para el estudio de la estructura-función de una proteína, una frecuencia de mutación que suponga la sustitución de un solo aminoácido por gen parece lo más deseable. Sin embargo, los ensayos de evolución molecular dirigida para mejorar propiedades enzimáticas, utilizan frecuencias mayores, induciendo entre uno y cuatro cambios de aminoácidos por gen en cada ciclo de evolución (Williams *et al.* 2004; Wong *et al.* 2006).

De esta manera, una única mutación que suponga una mejora de la proteína, se acumulará a través de ciclos iterativos de mutagénesis y selección en una estrategia evolutiva beneficiosa.

Muchas de las mutaciones introducidas por evolución molecular dirigida ocurren en la superficie de la proteína, lejos del centro activo, de manera que sus pequeñas contribuciones a la actividad total son muy difíciles de predecir y explicar. La inherente complejidad de las proteínas y la importancia de evolucionar el gen entero, en lugar de unos cuantos residuos limitados, subrayan la utilidad del diseño no racional mediante evolución dirigida (Arnold, 1998).

La combinación del diseño racional y el diseño empírico representan probablemente el acercamiento más poderoso para el desarrollo de nuevos biocatalizadores en el futuro (Zhao *et al.* 2002).

2.1.3 Estrategias de *screening*

Después de obtener las librerías de mutantes, el siguiente paso consiste en seleccionar de entre todas las mutantes, aquellas que hayan adquirido la función deseada. Se deben distinguir las pequeñas mejoras esperadas a partir de sustituciones de uno o varios aminoácidos dependiendo de la estrategia de mutación usada. En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de nuevos biocatalizadores generados por evolución dirigida. En el caso de enzimas, y específicamente cuando se desea mejorar la velocidad de reacción, es necesario realizar ensayos de actividad o detectar alguna consecuencia de ella. Para ello, las condiciones del ensayo de actividad se ajustan en un punto en el que la enzima nativa o parental esté cerca del límite de detección más bajo (Zhao *et al.* 1999). Las primeras enzimas modificadas genéticamente, presentaban funciones vitales para la célula, por lo que la selección era directa *in vivo* al estar asociadas las mejoras en la actividad estando asociadas con el crecimiento.

El mayor inconveniente del *screening* basado en el ensayo directo de la actividad, es que el tamaño de clonas de la librería que puede explorarse es limitado. El *screening* se realiza habitualmente en placas multipozo donde se crecen las mutantes de la genoteca y se induce la expresión de la enzima de interés, para posteriormente detectarla mediante métodos colorimétricos de detección de absorbancia o mediante la emisión de fluorescencia (Salazar *et al.* 2003). Si la proteína no es extracelular será necesario un paso previo de lisis celular. Alternativamente se puede realizar un *screening* inicial en placas Petri que contengan el sustrato de la enzima, eliminando así los clones que no posean actividad, siempre y cuando exista la necesidad de la actividad para el crecimiento (Zhao *et al.* 1999). El desarrollo de las técnicas sistemáticas o de *high-throughput* ha permitido el desarrollo de métodos de *screening* rápidos, sensibles y de costos moderados, además de incrementar el tamaño de las librerías de mutantes a explorar (miles de clones).

La aparición de los robots manipuladores de líquidos ha posibilitado la reducción de la variabilidad y el aumento de la reproducibilidad de los métodos de *screening*, además de facilitar enormemente la tarea del investigador. Existe una gran variedad de ensayos disponibles para *high-throughput screening* de librerías enzimáticas (Williams *et al.* 2004; Goddard *et al.* 2004).

Eligiendo métodos de *screening* adecuados, pueden mejorarse otras propiedades, incluso de forma simultánea, como la actividad de una enzima o su estabilidad frente a disolventes orgánicos (Zumárraga *et al.* 2007), temperatura (Mordukhova *et al.* 2008) o pH (Lin *et al.* 2009), entre otras. Además, mediante esta técnica también se pueden generar nuevas actividades o especificidades en una enzima, fenómeno conocido como migración catalítica Raillard *et al.* (2001), o simplemente aumentar la expresión génica de una determinada proteína en un hospedador Bulter *et al.* (2003).

Tabla 3. Ejemplos de nuevos biocatalizadores generados por evolución dirigida (Farrés *et al.* 2008).

Enzima	Modificación	Método de mutagénesis	Selección y/o aislamiento	Resultado	Observaciones	Referencia
Lipasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Incrementar enantioselectividad	ep-PCR y cepas mutagénicas	Ensayos microplacas con p-nitrofenil ésteres	Incremento de enantioselectividad de 1 a 26	5 mutaciones, ninguna en el sitio de unión del sustrato	Liebeton <i>et al.</i> , 2000; Reetz <i>et al.</i> , 1999; Reets <i>et al.</i> , 2000
Esterasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Actividad en presencia de dimetilformamida (DMF)	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Ensayos microplacas con p-nitrofenil ésteres	Incremento 150 veces la estabilidad en DMF	Mayor actividad sobre p-nitrofenil éster de palmitato que sobre éster de butirato	Arnold & Moore, 1997.
Hemoperoxidasa de <i>Coprinus cinereus</i>	Estabilidad y actividad bajo condiciones de lavado	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Incubación microplacas a pH alcalino, con H ₂ O ₂ , Actividad residual	Aumento 100 veces la estabilidad en H ₂ O ₂ y 170 veces la termoestabilidad		Cherry <i>et al.</i> , 1999

Hidantoinasa de <i>Arthrobacter sp.</i>	Enantioselectividad reversa (isómero L)	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Ensayos microplacas con D y Lhidantoínas	Cambio de actividad sobre el isómero	Incremento adicional de la actividad específica	May <i>et al.</i> , 2000
Subtilisina S41	Incrementar termoestabilidad	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Crecimiento en placa a temperaturas altas	Variante activa en el rango de 10-60°C		Miyazaki <i>et al.</i> , 2000
Esterasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Incrementar termoestabilidad	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa a temperaturas altas	Incremento de 14°C en la termoestabilidad		Giver <i>et al.</i> , 1998
Glutarilacilasa de <i>Pseudomonas SY77</i>	Incrementar la actividad de adipilacilasa	ep-PCR sobre la subunidad α y cepas mutagénicas	Crecimiento en placa en adipilleucina	Incremento de la relación V_{max}/K_m para adipil-7-ADCA		Sio <i>et al.</i> , 2002
Varias subtilisinas	Varios parámetros simultáneamente	Barajado de genes	Ensayos microplacas	Se obtienen variantes químicas muy activas	Se genera mucha diversidad	Ness <i>et al.</i> , 1999
Varias fitoeno desaturasas y licopenoclasas	Generación de nuevos carotenoides	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa, identificación visual	Carotenoides nuevos (torolueno)	Se evolucionó la vía de biosíntesis completa	Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000
Amilosacarasa de <i>Neisseria polysaccharea</i>	Incrementar de actividad, termoestabilidad y resistencia a solventes orgánicos	PCR error-prone Random mutagenesis	Crecimiento en placa y cultivos pequeños en pozo	Incremento de actividad four-fold e incremento de termoestabilidad		Emond-Monsan <i>et al.</i> , 2007

2.1.4 Alternativas en la búsqueda de mutantes de IsIA4 con mayor actividad

Con el objetivo de incrementar los rendimientos de FOS, favorecer su estabilidad y especificidad de la reacción de la IsIA4, se plantea realizar estudios mutagénicos aplicando una estrategia de evolución dirigida específicamente con la técnica de PCR *error-prone*, los cuales se basan en la generación de millones de mutantes dentro de las que se espera generar nuevas enzimas con muy diversas propiedades, incluidas mutantes con mayor eficiencia catalítica. Sin embargo,

éstas son muy probablemente unas cuantas dentro de los cientos de miles generadas.

En investigaciones anteriores, Bart *et al.* (2004) utilizaron ingeniería combinatoria para mejorar el rendimiento de amilosacarasa en cepas transformadas de *E. coli*. Después de obtener gran variedad de clonas fue necesario determinar la actividad de amilosacarasa. Sin embargo al carecer de un método automatizado para la cuantificación de actividad por reacción con DNS, los autores se vieron obligados a llevar a cabo la reacción del ensayo de actividad en un baño de agua a ebullición, requiriendo de una intervención manual que rompe y limita el proceso automatizado.

En el laboratorio de Biocatálisis del IBt-UNAM, se han hecho experimentos siguiendo esta estrategia, sin embargo al manejar gran variedad de muestras de forma manual, no solo se limita el número de muestras que es posible analizar por individuo, sino que además se obtienen resultados poco precisos, entre otras causas debido a que las células no reciben el calor uniformemente, además de otros problemas técnicos.

En este sentido la alternativa es desarrollar métodos de selección apropiados que puedan efectuarse a temperaturas compatibles con un robot y que distingan mutantes con características interesantes. Para ello, se dispone de dos estrategias.

La primer estrategia se basa en la medición de azúcares reductores (Miller, 1959) liberados como consecuencia de la actividad de la enzima sobre sacarosa, donde la reacción con el reactivo DNS se lleva a cabo usualmente a ebullición (100 °C). Debido a la gran cantidad de mutantes que surgen, es necesario tener un instrumento automatizado que –acoplado a un robot- permita analizar la gran mayoría de las mutantes generadas.

El robot permite realizar la primera etapa, es decir la incubación de las enzimas producidas con su sustrato (la sacarosa) 30 °C. Después de la reacción enzimática se agrega el reactivo de DNS de forma automatizada en cada una de las muestras para la medición de los azúcares reductores producidos, pero forzosamente tendría que realizarse a baja temperatura ya que el instrumento con el que se cuenta en el Instituto de Biotecnología *Robot de manipulación y alicuotado de muestras líquidas TECAN mod. GENESiS Workstation 150, (con lector de placas ELISA Safire)* no puede operar a una temperatura mayor de 50 °C como, característica que presentan en general éste tipo de equipos.

Para poder entonces realizar este ensayo de selección *in situ* es condición indispensable adaptar el método de determinación de azúcares reductores a temperaturas menores de 50 °C, aspecto que será abordado en la primera parte de este estudio.

La segunda estrategia se basa en la identificación y selección de cepas mutantes con base en su fenotipo viscoso en medio mínimo con sacarosa al 5% como única fuente de carbono. Esta hipótesis fue validada previamente por Bart (2004) en estudios con la amilosacarasa.

Debido a la importancia de los alimentos funcionales elaborados a partir de FOS se plantea también la posibilidad de mejorar la actividad enzimática de la IslA4-S425A para su producción industrial. Para ello, con ayuda de la evolución dirigida, se pretende desarrollar librerías mutagénicas para la generación de enzimas con estas dos características: mayor actividad enzimática y mayor producción de FOS. Para este fin, se requiere primeramente el montaje de métodos de screening que permitan diferenciar FOS de manera directa. En este sentido, se plantea primeramente establecer las condiciones de PCR *error-prone* con la versión IslA4 (capaz de producir polímero de fructosa de alto peso molecular) para la generación de librerías mutagénicas, de las que sea posible seleccionar una mutante sobre-productora de inulina, debido a la formación de un fenotipo mucoso

alrededor de la colonia relacionado con su mayor actividad catalítica y capacidad transferasa. Si esta estrategia resulta exitosa, es posible obtener una mutante con mayor actividad catalítica y posteriormente realizar la mutación sitio-dirigida ya conocida S425A con la finalidad de obtener una enzima con alta actividad catalítica y productora de FOS.

3.0 Hipótesis

Aprovechando las características de la reacción que cataliza la fructosiltransferasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (IsIA4) es posible desarrollar métodos de screening que puedan aplicarse de forma masiva y que den lugar a la obtención de mutantes con nuevas propiedades, mediante la utilización de técnicas de evolución dirigida.

4.0 Objetivo

4.1 Objetivos específicos

- Adaptar el método de determinación de azúcares reductores reportado por Miller en 1959 a bajas temperaturas, a partir de un estudio cinético de la reacción.
- Determinar las diferentes condiciones de tiempo y temperatura para la determinación de azúcares reductores mediante el ensayo de DNS, definiendo los límites inferiores de detección del método en términos de actividad enzimática (concentración de enzima) y tiempo de reacción enzimática.
- Definir una estrategia de selección de variantes del gen que codifica para la IsIA4 con base en la capacidad de la enzima para producir polímero y glucosa, dando lugar a un fenotipo característico en las cepas de *E.coli* con el gen clonado.
- Generar librerías de mutantes del gen IsIA4 por medio de la técnica de PCR *error-prone*.

5.0 Materiales y métodos

5.1 Material biológico

La cepa de *Leuconostoc citreum* CW28 se obtuvo de la colección de cepas aisladas del pozol por la Dra. Carmen Wachter Rodarte de la Facultad de Química, UNAM.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizados en este estudio se enlistan a continuación indicando sus principales características.

Tabla I. Cepas utilizadas, con genotipo.

Cepa *	Genotipo
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
JM101	glnV44 thi-1 Δ(<i>lac-proAB</i>) F'[lacI ^q ZΔM15 traD36 proAB ⁺]
TG1 (Lucigen)	F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> ΔM15] <i>supE thi-1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5, (r _K ⁻ m _K ⁻)
Top 10 (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻
XL1-Blue (Stratagene)	endA1 gyrA96(<i>nal^R</i>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)
<i>E. coli</i> C	<i>Cepa silvestre</i> ATCC 8739

Tabla II. Plásmido utilizado.

Plásmido	Características	Referencia
pET 28 b +	Vector con región de clonación y expresión	http://www.genomex.com/vector_maps/pET28_map.pdf (NOVAGEN)

5.2.0 Medios de cultivo

Las cantidades que se muestran a continuación se ajustan a un litro de solución.

5.2.1 Medio Luria Bertani

En caso de preparación de medio sólido se adicionan 15 g de *Bacto agar* por cada litro de solución.

Medio LB pH 7.5	(g)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

5.2.2 Medio mínimo M9

En caso de preparación de medio sólido se adicionan 15 g de *Bacto agar* por cada litro de solución.

Medio mínimo M9	mL
Sales M9 (10X)	100
MgSO ₄ (1M)	2
CaCl ₂ (1M)	0.1
Sacarosa (20%)	250
Vit B1 (1%)	0.1
Kan (50mg/mL)	1
H ₂ O	646.8

5.2.3 Sales M9 (10X)

Sales M9 10X	(g)
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	60
KH ₂ PO ₄	30
NaCl	5
NH ₄ Cl	10

5.3.0 Soluciones

Las cantidades que se muestran a continuación se ajustan a un litro de solución.

5.3.1 Reactivo DNS (Por litro de solución).

Componente	masa (g)
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	300
NaOH	16
DNS	10

5.3.2 TAE 1X Amortiguador usado para realizar la electroforesis en geles de agarosa.

Componentes	[mM]
Tris base	40
Ácido acético	20
EDTA	1

Ajustar a pH 8

5.3.3 Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6

Componente	(g)
K_2HPO_4	0.4877
KH_2PO_4	6.3967

Ajustar a pH 6

5.3.4 Solución de CaCl_2 100 mM

Componente	(g)
CaCl_2	11.1

5.3.5 Glicerol 80%

Empleo: como crio-protector en preparación de células competentes.

Componente	(mL)
Agua (MQ)	200
Glicerol (100%)	800

5.4 Kits de Biología Molecular

Kits de Biología Molecular	
<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	<i>Roche</i>
<i>Gene Jet extraction Kit</i>	<i>Fermentas</i>

5.5 Enzimas utilizadas

Enzimas	
<i>Nde I</i>	<i>New England Biolab</i>
<i>Xho I</i>	<i>New England Biolab</i>
Ligasa DNA T4	<i>New England Biolab</i>
Taq Polimerasa	<i>Instituto de Biotecnología UNAM</i>

5.6 Antibióticos

Antibiótico	Conc. Trabajo (mg/mL)	Conc. Final en placa (µg/mL)
Ampicilina (Roche)	100	100
Kanamicina (Roche)	50	50
Tetraciclina (Roche)	15	15

5.7 Equipos

- Espectrofotómetro *DU® 650 BECKMAN*.
- Termociclador *Touchgene Gradient TECHNE*. Software versión 22.02 A
- *UV Transilluminator UVP Mini Darkroom*. Software *LabWorks UVP Bioluming Systems GDS-8000 System Version 4.5.00*.
- Secuenciador automático *Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730*

5.8.0 Producción inulosacarasa IsIA4

La producción de la enzima se realizó mediante procesos de fermentación en matraces Erlenmeyer de 250 mL inoculando de *E. coli* BL21 (D3) transformada con el plásmido *pet28b-IsIA4* durante 18 h a 37 °C y 200 rpm. Se inoculo con 15 mL de la fermentación anterior un litro de medio LB-km 50 µg/mL, las células se cultivaron a 37 °C. El progreso de la reacción se siguió midiendo la densidad óptica (D.O) a 600 nm hasta alcanzar una absorbancia entre 0.6 (aproximadamente a las 2-3 horas). Después se indujo la producción de la enzima agregando IPTG para alcanzar una concentración final de 0.2 mM, se cultivaron a 18 °C durante 6 h y 100 rpm. Al finalizar el cultivo se cosecharon las células por centrifugación (4000g, 20 minutos, 4 °C) y se lavaron con amortiguador de fosfatos 50 mM pH6, conteniendo 1mM CaCl₂ se resuspendieron empleando 5mL del mismo amortiguador por cada litro de cultivo (Rodríguez *et al.* 2010). Posteriormente las células se rompieron por congelamiento-descongelamiento en presencia de lisozima (1 mg/ml de suspensión celular) y por sonicación, (Ultrasonic processor) a 130 watts-20kHz por 4 ciclos de 30 segundos cada uno. El extracto enzimático se separó de los restos celulares por centrifugación a 10 000 g, durante 25 min a 4 °C. Se obtuvo un extracto enzimático con actividad de 740 U/L de fermentación, determinada por el método original de Miller, (1959).

5.8.1 Determinación de actividad enzimática

La actividad de la IsIA4 es determinada cuantificando los azúcares reductores liberados, por el método de DNS (Miller, 1959) en presencia de 100g/L de sacarosa en amortiguador de fosfatos 50mM pH 6, CaCl₂ 1 mM incubando a 30 °C. A determinados tiempos de incubación se toman 50 µL de mezcla de reacción y se agregan a 50 µL del reactivo de DNS, se lleva a temperatura de ebullición durante 5 minutos, se enfría en hielo 5 minutos, se adiciona 0.5 mL de agua y finalmente se lee la absorbancia a 540 nm (condiciones estándar).

Una unidad de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima que transfiere 1 μmol de fructosa por minuto (Chen, *et al.* 1996; Dorta *et al.* 2006) o como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto (Sangeetha *et al.* 2005 a).

El método de Miller 1959, se fundamenta en la reacción a ebullición de los grupos reductores de azúcar con el reactivo oxidante ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrosalicílico (amarillo) formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (marrón) (figura 9). Una vez terminada la reacción con DNS se agrega agua destilada, diluyendo los productos de la reacción, midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm. Con éste método se pueden detectar de 0.5 a 2.0 g/L de azúcares reductores. Dado que éste método se desarrolló para la reacción de hidrólisis de sacarosa, los estándares se preparan con mezcla equimolar de glucosa y fructosa. La viabilidad de esta misma reacción a menores temperaturas fue la base de una de las metodologías desarrolladas en este trabajo.

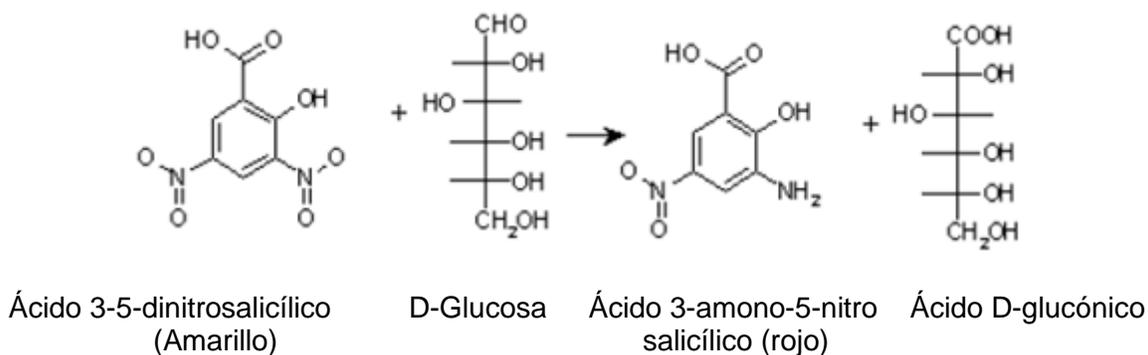


Figura 9. Reacción química del reactivo DNS con un azúcar reductor.

5.9.0 Técnicas de biología molecular

5.9.1 Purificación de ADN

El ADN plasmídico se extrajo con el Kit *High Pure Plasmid Isolation* de Roche siguiendo las indicaciones del proveedor a partir de cultivos crecidos toda la noche en medio LB adicionado con el antibiótico requerido.

El principio de método se basa en la forma circular del ADN plasmídico y en su pequeño tamaño, para lograr su separación del resto de moléculas de ácidos nucleicos. La lisis celular se consigue mediante la aplicación de diversos agentes (enzimas, álcali, detergentes, solventes orgánicos, calor). El método clásico se sustenta en la incubación de lisozima, seguida del tratamiento con detergentes (a elevada temperatura o en presencia de álcali). Tras la lisis celular, incluye una incubación en medio alcalino que desnaturaliza el ADN, donde las grandes moléculas de ADN cromosómico adoptan estructuras desorganizadas, lo que dificulta su re naturalización posterior. En cambio, las moléculas pequeñas de ADN nuevamente se re asocian fácilmente, cuando son llevadas nuevamente a un pH neutro, mediante la adición de una solución con pH ácido. En esta nueva disolución, que incorpora una alta concentración salina, precipita el ADN cromosómico desnaturalizado y proteínas, por lo que una simple sedimentación permite obtener en el sobrenadante las moléculas de ADN plasmídico renaturalizadas y solubles (Sambrock *et al.* 1989).

5.9.2 ADN proveniente de reacciones de PCR y de digestiones con enzimas de restricción

Para los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR y de digestiones con enzimas de restricción se purifican a partir de banda de agarosa con el Kit *Gene Jet extraction Kit* de Fermentas siguiendo las indicaciones del proveedor.

5.9.3 ADN proveniente de reacciones de ligación

Después de realizar la ligación y desactivar la enzima a 75 °C/10 minutos, el producto de ligación se purifica agregando 500 μ L de butanol, agitando bien con el *vortex* durante 30 segundos, seguida de una centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm, en el fondo del tubo *Eppendorff* se logra observar un precipitado blanco, se elimina con la micro pipeta el excedente de butanol y por último se seca al vacío en SAVANT a 65 °C hasta evaporar por completo el butanol. Finalmente se agregan 10 μ L de agua tetra destilada estéril para disolver la ligación.

5.9.4 Electroforesis de ADN

Esta técnica de separación se sustenta en el movimiento o migración de esta biomolécula a través de una matriz o soporte reticulado de agarosa como resultado de un campo eléctrico. La movilidad electroforética depende de la longitud, la topología de las moléculas de DNA, porosidad del soporte (agarosa) y corriente aplicada (Maniatis *et al.* 1982; Perera *et al.* 2002).

Para analizar los productos de PCR obtenidos se utilizaron 5 μ L de reacción y se corrieron en geles de agarosa al 1%, en amortiguador TAE al 0.5X, a 100mV durante 40 minutos. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 0.02% durante 10 segundos y se destiñeron en agua destilada durante 15 minutos. La visualización de las bandas se llevo a cabo en el transiluminador *UV O Mini Darkroom*.

5.9.5 Secuenciación

Las secuencias obtenidas en este trabajo se realizaron en el secuenciador automático *Perkin Elmer/Applied Biosystems* Modelo 3730 en la Unidad de Secuenciación Automática de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos).

5.9.6 Análisis de las secuencias de ADN

Los alineamientos entre secuencias y aminoácidos se realizaron con el programa *Clustal W*. Las comparaciones de las secuencias tanto nucleótídicas como de aminoácidos con las bases de datos se realizaron utilizando distintas versiones Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

5.9.7 Obtención de células competentes

La competencia es el estado fisiológico característico que permite captar DNA del medio exterior, éste es diferente para cada especie capaz de experimentar transformación y dentro de cada especie está influido por una serie de factores (densidad celular, temperatura, pH, nutrientes, etc.) (Maniatis *et al.* 1982; Sambrook *et al.* 1989).

5.9.8 Protocolo I para preparar células de *E. coli* electro competentes

1. Inocular con 3 colonias de *E. coli* aisladas un tubo de ensaye estéril, con 5 mL de medio LB e incubar a 37 °C durante 16 horas.
2. Efectuar una resiembra 1:100 del inculo a 50 mL de medio LB en condiciones estériles e incubar a 37 °C, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6-0.8.
3. Transferir las células a tubos *Falcon* estériles y dejar reposar en hielo durante 15 minutos.
4. Centrifugar a 5000g durante 5 minutos a 4 °C.
5. Eliminar el sobrenadante.
6. Lavar las células con agua estéril a 4 °C y resuspender suavemente y eliminar el sobrenadante.
7. Repetir el paso 6, tres veces en total.

8. Agregar glicerol a una concentración final del 10%.
9. Distribuir 50 μ L en tubos eppendorff (en este paso se recomienda hacer la transformación).
10. Almacenar a -70 °C (se ha observado que al almacenar durante largos periodos de tiempo la capacidad competente de la célula disminuye).

5.9.9 Transformación de *E. coli* por electroporación

La electroporación es la transferencia de moléculas de DNA al interior de la célula procariota basado en la utilización de descargas eléctricas que producen cambios físico-bioquímicos; alterando entre otras propiedades, el potencial de membrana, produciendo desorganizaciones y roturas transitorias, que hacen que la célula sea permeable a distintas macromoléculas (y permite el paso de DNA exógeno) (Maniatis *et al.* 1982). La formación de poros fue postulada como una explicación del fenómeno y del cual deriva el nombre de la técnica (Sambrock, *et al.* 1989; Perera, *et al.* 2002).

Los parámetros físicos más importantes a tener en cuenta para optimizar la eficiencia son el voltaje aplicado y la constante de tiempo del pulso. Típicamente, el campo aplicado oscila entre 6-12 kV/cm, pero cada bacteria necesita un óptimo. La fracción de células que sobrevive después del pulso eléctrico decrece a medida que el voltaje aumenta. En cuanto a las propiedades de las bacterias, la composición de la membrana y el espesor, densidad y estructura de la pared son los aspectos que más influyen en el éxito del proceso; así como el propio medio en que van a ser conservadas y electroporadas (Dower *et al.* 1988; Perera *et al.* 2002).

Este es un método que produce altos rendimientos (entre 10^9 – 10^{10} transformantes por μ g de DNA, con un 80% de supervivientes en *E. coli*) y sobre todo, que puede ser aplicado a muy distintos tipos de células bacterianas y eucariotas.

5.9.9.1 Protocolo II Transformación de *E. coli* por electroporación

1. En condiciones estériles, tomar 3 μL de DNA y agregarla a 50 μL de células competentes incubar en hielo durante 10 minutos.
2. Transferir las células a una celda fría para electroporar, puede ser de 0.1 cm o 0.2 cm (*Bio Rad*).
3. Aplicar el pulso eléctrico en la cámara electroporadora (normalmente la cámara ya tiene programado el impulso eléctrico necesario para la transformación en *E. coli*, que es de 1.8 K volts para el primer tipo de celdas y 2.4 K volts para celdas de 0.2 cm).
4. Agregar inmediatamente 1 mL de medio SOC a la celda.
5. Resuspender las células y transferir a un tubo eppendorff estéril de 1.5 mL.
6. Incubar a 37 °C en agitación continua 200rpm, durante 1 hora.
7. Platear 30 μL de las células transformadas en cajas petri con medio LB y el antibiótico correspondiente, al cual da resistencia el plásmido (kanamicina).
8. Incubar a 37 °C durante 16 horas.

5.9.9.2 Obtención del material genético de librerías mutagénicas

Una vez transcurridas las 16 horas de incubación se obtienen las librerías mutagénicas, sin embargo es importante aclarar que se encuentran en la cepa *E. coli TG1* y en medio LB con kanamicina.

5.9.9.3 Construcción de librerías mutagénicas empleando PCR *error-prone*

Las librerías mutagénicas del gen *IslA4* de *L. citreum CW28* se realizaron con la *Taq polimerasa* (producida en el Instituto de Biotecnología, UNAM). En general el volumen final de reacción fue de 100 μL colocando los volúmenes de reactivo según se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para la reacción de PCR estándar por PCR error-prone con Manganeso (alta mutagenicidad) y sin Manganeso (baja mutagenicidad).

	Estándar	Gerald F. Joyce c/Mn	Gerald F. Joyce s/Mn
Buffer 10x	10	10	10
DNTP's (µL) (tabla18)*	10	10	10
Templado plásmido pet28b-lsIA4	3	2	2
Oligo Forward(Nde I) (10 pmol/µL)	1	1	1
Oligo Reverse(Xho I) (10 pmol/µL)	1	1	1
Agua tetradestilada	62	61	61
MgCl ₂ (50mM)	8	8	10
Taq polimerasa (IBT)	5	5	5
MnCl ₂ (5mM)	-	2	-
Total (µL)	100	100	100

Los oligonucleótidos para la amplificación se describen en la tabla 5 y fueron diseñados con el *Software Sci Ed Central Clone Manager 1.3* y sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Tabla 5. Oligonucleótidos que se utilizaron para las reacciones de PCR.

	Longitud (b)	Secuencia (5'→3')	PM (g/mol)
Oligo (Nde I) Forward	20	CGGCAGCC <u>CATATG</u> ACTAGTG	6465
Oligo (Xho I) Reverse	20	GGTGGTGCT <u>TCGAG</u> TATTCAA	6511

Para las reacciones de PCR *error-prone* se desbalancean las concentraciones de dNTP's con el fin de generar mutaciones en el gen. Los dNTP's se preparan a partir de soluciones stock con una concentración inicial de 100 mM, diluyéndolos

hasta obtener las concentraciones finales en la mezcla de reacción de acuerdo a lo que se indica en la tabla 6.

Tabla 6. *Concentraciones finales de dNTP´s en la reacción de PCR error prone.*
d NTP (mM)

<i>* Mezclas dNTP</i>	A	G	T	C
STD	0.1	0.1	0.1	0.1
Gerald F. Joyce	0.02	0.02	0.1	0.1

Las reacciones se realizaron en el termociclador *Touchgene Gradient*. El tiempo de elongación se seleccionó de acuerdo a la longitud del fragmento amplificado de ADN, tomando en cuenta que para cada 1000 pb se requiere de un tiempo de extensión de 1 minuto. Las condiciones de reacción generales se mencionan en la tabla 7.

Tabla 7. *Condiciones de reacción para las reacciones de PCR.*

No de ciclos	Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Desnaturalización	5	94
30	Desnaturalización	1	94
30	Alineamiento	1	52.2
30	Extensión	2	72
1	Extensión final	10	72

Después de llevar a cabo las reacciones PCR error-prone los productos se purifican y digirieren con las enzimas *NdeI* y *Xho I*. El plásmido *pet 28 b-lsIA4*, también se digiere con las mismas enzimas para liberar el vector *pet28 b*. Las digestiones se realizaron en las condiciones mostradas en la tabla 8, incubando a 37 °C durante 16 horas.

Tabla 8. Condiciones para las digestiones enzimáticas del plásmido y de la PCR mutagénica.

	μL	μL
Plásmido puro (pet 28b-IsIA4) ~20 ng/μL	50 (1000 ng)	0
PCR pura ~60 ng/μL	0	50 (3000 ng)
Buffer 2 <i>(New England Biolab)</i>	6	6
Enzima (Nde I)	2	2
Enzima (Xho I)	2	2

El fragmento correspondiente al vector pet28b y los productos de PCR error-prone se purifican por banda y se realiza la ligación entre el vector pet28b y los productos de PCR, empleando la enzima *T4 DNA ligase* (*New England Biolabs*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando una relación inserto: vector 3:1 (mol: mol) e incubando la ligación a 16 °C durante 72 horas. Las condiciones de ligación se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones para la Ligación del vector y la PCR mutagénica.

	Control (μL)	Producto de PCR (μL)
Vector (5369pb)	4 (80 ng)	4 (80 ng)
Inserto (1623pb)	0	1.6 (80 ng)
Buffer	2	2
Enzima T4 ligasa	1	1
Agua	13	11.4
Vol. Final	20	20

Considerando que el producto de PCR tiene una concentración de 50 ng/μL y el vector de 20 ng/μL.

Después de realizar la ligación como se indica en la tabla 9, el ADN se purifica con butanol.

La ligación pura se transforma en células de *E. coli TG1* electrocompetentes recién preparadas. Las células se platan en cajas *petri* con medio LB y kanamicina 25 mg/mL, se incuban a 37 °C durante 16 horas.

5.9.9.4 Análisis de las librerías mutagénicas

Las librerías mutagénicas obtenidas en *E. coli TG1*, se recuperan agregando 3 mL de medio LB a cada caja *Petri*, con una espátula de vidrio o asa microbiológica estéril raspar las colonias obtenidas y almacenar. Extraer el ADN plasmídico transformar células competentes de *E. coli C* con este DNA, crecer en cajas *petri* LB-kanamicina 50 µg/ml. Las células obtenidas se recuperan en medio M9, se lavan 4 veces con este medio y se resuspenden en 1 ml del mismo medio. Medir D.O. a 600nm, realizar las diluciones correspondientes con medio M9 para platear alrededor de 2500 colonias en cajas *Petri* de 25 x 25 cm con medio M9-5% de sacarosa-kanamicina 50 µg/mL. Considerar que 1 DO ~ 8 x 10⁸ células /mL. Incubar a 30 °C durante 120 horas. Observar y seleccionar las colonias mucoides.

6.0 Resultados y análisis

6.1 Primera parte

Método de selección mediante el ensayo directo de la actividad enzimática.

6.1.1 Adaptación de las condiciones del método DNS para la medición de azúcares reductores en condiciones de baja temperatura

Primeramente se ajustaron los volúmenes de los reactivos para hacer más flexible y sensible el método de análisis de poder reductor. Se decidió medir la absorbancia generada de la reacción sin diluir los productos al término de la misma y reducir el volumen del ensayo a 0.5mL es decir, 0.25mL de reactivo DNS y 0.25mL de muestra. Con estas modificaciones es posible obtener una relación lineal entre absorbancia y concentración en el rango de de 0.1 g/L a 0.5 g/L de azúcares reductores medidos como glucosa, como se muestra en la figura 10. Con el fin de analizar el efecto de la temperatura en la reacción se realizaron reacciones en el rango de concentración de 0 – 0.5 g/L de mezclas equimoleculares de glucosa-fructosa, tanto a ebullición durante 5 minutos (como indica la técnica tradicional) como a las temperaturas de 40, 45 y 50 °C con el fin de definir condiciones viables para ser adaptadas al equipo automatizado de acuerdo al tiempo y temperatura, considerando que el equipo automatizado no puede trabajar a temperaturas mayores de 50 °C

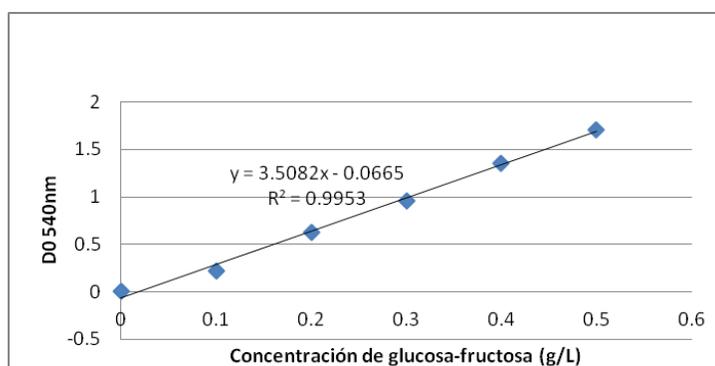
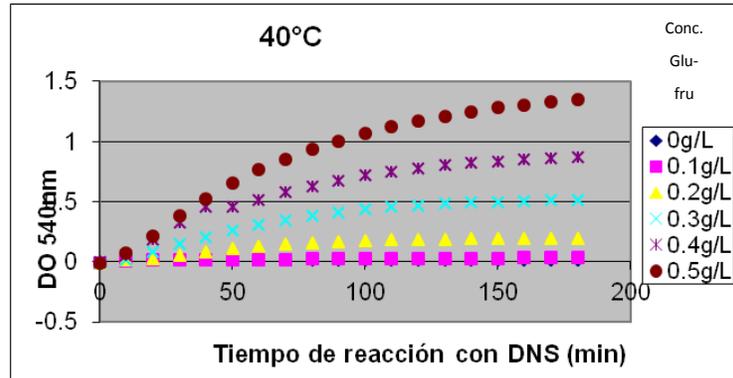
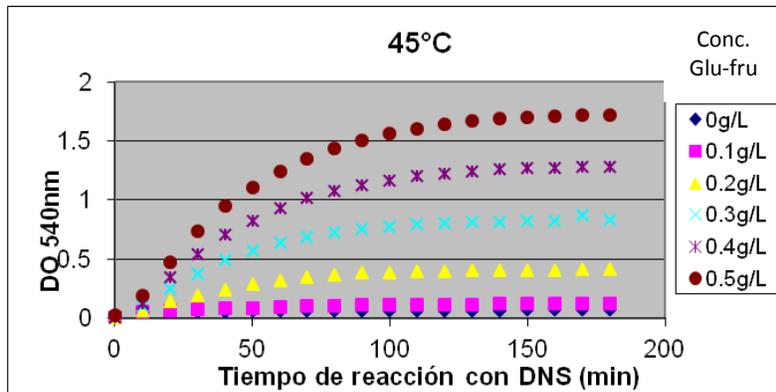


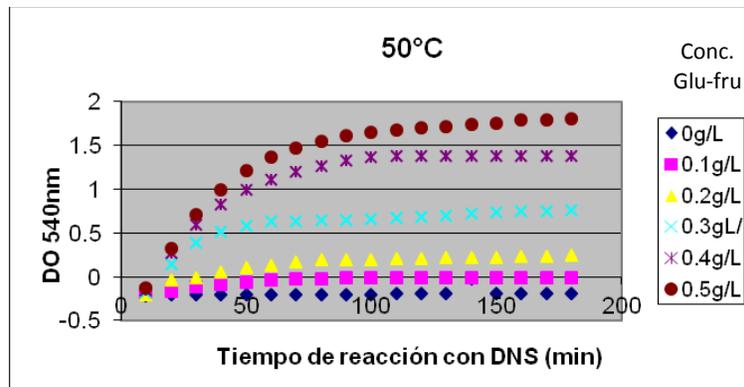
Figura 10. Curva patrón para el ensayo de DNS en condiciones de reacción estándar (5 minutos a ebullición).



(a)



(b)



(c)

Figura 11. Influencia de la temperatura y la concentración de reductores en la cinética de reacción del ensayo de Miller, empleando 0.5 mL de reacción, a diferentes concentraciones de azúcares reductores. (a) 40 °C, (b) 45 °C (c) 50 °C. La absorbancia se mide directamente de la reacción sin diluir.

En la figura 11 (a, b y c) se muestra la evolución de la reacción azúcares reductores- DNS a tres temperaturas para diferentes concentraciones de reductores en el rango de 0 a 0.5 g/L, temperaturas compatibles con el equipo automatizado. En principio se decidió realizar los ensayos a 45 °C durante 160 minutos ya que como se observa en la figura 11 b, a los 120 minutos de reacción con DNS reaccionan prácticamente todos los azúcares reductores, como lo demuestra el hecho de alcanzar una lectura colorimétrica final prácticamente constante.

Se descartó la mayor temperatura (50 °C) ya que se forzaría el equipo de trabajo a operar en sus límites, mientras que a 40 °C después de tres horas no se observa la estabilización de la DO, es decir, la velocidad de reacción disminuye tanto que a ese tiempo aún no termina la reacción con DNS.

Una vez seleccionada la temperatura de reacción en 45 °C, se estudió la influencia del tiempo de reacción en la estandarización de las nuevas condiciones para el ensayo. Se utilizarán las siglas CBT, para referirse a la reacción con DNS en condiciones de baja temperatura (45 °C durante 160 minutos). En la figura 12 se muestran los resultados, incluyendo en rojo la curva patrón obtenida a temperatura de ebullición.

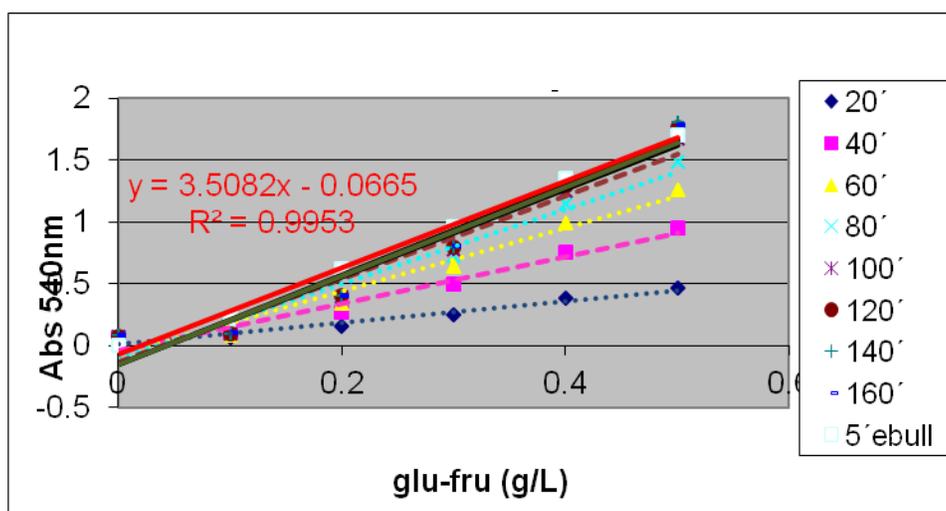


Figura 12. Influencia del tiempo de reacción del ensayo en las curvas patrón del método de DNS a 45 °C en el rango de 0 a 0.5 g/L de azúcares reductores. La curva patrón en condiciones estándar se muestra en color rojo.

Tabla 10. Valores de pendientes y ordenadas al origen de las curvas patrón obtenidas a diferentes tiempos de reacción reportadas en la figura 12.

tiempo (min)	Ordenada al origen b	Pendiente
20	0.0123	0.8766
40	-0.0352	1.8946
60	-0.0723	2.5649
80	-0.1034	3.0226
100	-0.1322	3.3697
120	-0.1475	3.5469
140	-0.1537	3.6261
160	-0.1469	3.5896
M. Estándar	-0.0665	3.5082
Promedio 120-160	-0.1493	3.58753

Las pendientes de las curvas patrón son necesarias para transformar las lecturas de absorbancia a cambios de concentración de reductores y así cuantificar la actividad enzimática de la enzima IsIA4. Como puede observarse en la figura 11, el tiempo de reacción es crítico ya que solo después de 120 minutos se alcanza un valor en la pendiente prácticamente constante y muy cercano al que se obtiene en reacciones llevadas a cabo en las condiciones de reacción convencionales, resultado de la conclusión de la reacción. Así, aunque lo que se busca en este caso es un método rápido no necesariamente muy preciso, es necesario tomar las lecturas a este tiempo, para evitar errores importantes en la cuantificación de los azúcares.

6.1.2 Determinación de actividad enzimática de IsIA4 por el método DNS en condiciones de baja temperatura (45 °C)

Una vez establecidas las condiciones para determinar azúcares reductores a bajas temperaturas se procedió a medir actividad enzimática empleando dicho método. Para ello se realizó un análisis de los niveles de actividad mínimos a partir de los cuales se puede detectar actividad, simulando lo que sucederá en el equipo automatizado que generará cepas de actividad variada, que irán desde no tener actividad, hasta las mutantes buscadas, pasando por las enzimas que no sufran modificación en la actividad de la enzima silvestre.

Por otro lado, la mutante IsIA4 S425A alcanza niveles de actividad de 0.028 U/mL de fermentación, por lo que se realizaron ensayos preparando muestras con concentraciones de enzima desde 0.014 hasta 0.05 U/mL realizando diluciones como se describe en la tabla 5, para un volumen de reacción de 1500 μ L.

Se tomaron muestras de 250 μ L de la reacción enzimática cada 20 minutos hasta llegar a los 100 minutos de reacción. Cada muestra se hizo reaccionar con 250 μ L de reactivo DNS. Las muestras así obtenidas se incubaron a 45 °C en un espectrofotómetro DU® 650 BECKMAN, con sistema de control de temperatura y adquisición de datos automático. El equipo se programo para adquirir lecturas a

DO 540nm cada 10 minutos de la reacción de las muestras con el reactivo DNS durante 180 minutos.

Tabla 11. Tabla de reactivos para la preparación de muestras de enzima de actividad variable para un volumen de reacción de 1500 μL .

Muestra	μL Buffer	μL sacarosa 60%	μL CaCl_2	μL extracto enzimático de IsIA4 E4 (dilución 1:10)	Unidades enzimáticas teóricas/mL
I	1247	250	15	3	0.0148
II	1246	250	15	4	0.0197
III	1245	250	15	5	0.0246
IV	1244	250	15	6	0.0295
V	1243	250	15	7	0.0345
VI	1242	250	15	8	0.0394
VII	1240	250	15	10	0.0492

A pesar de que se realizaron ensayos a todas las concentraciones de enzima que se muestran en la Tabla 11, para evitar un exceso de datos en el presente trabajo solo se presentan como ejemplo los gráficos a dos concentraciones diferentes de enzima; la más baja (Muestra I), que se describe en las figuras 13, 14, 15 y la más alta del ensayo (Muestra VII) que se describe en las figuras 16, 17 y 18. Considerando los valores de DO 540nm se calculó la actividad IsIA4 que se obtendría de los datos a cada tiempo de reacción enzimática, con los valores de las curvas estándar mostrados en la figura 12 (Tabla 10). Así mismo y con fines comparativos se realizaron los ensayos de actividad con el método estándar (ME) resultado que se presenta en la figuras 13 y 16.

En la figura 13 se observa el incremento de DO con el tiempo de reacción enzimática como consecuencia de la reacción con DNS en condiciones estándar. El tiempo de la reacción enzimática, se refiere al tiempo de incubación a 30 °C, en

el cual se tomaron muestras cada 20 minutos y se obtuvo un valor de 0.01543 U/mL. En realidad la figura 13 corresponde a un ensayo convencional salvo por el hecho de haberse modificado los volúmenes de reacción de DNS.

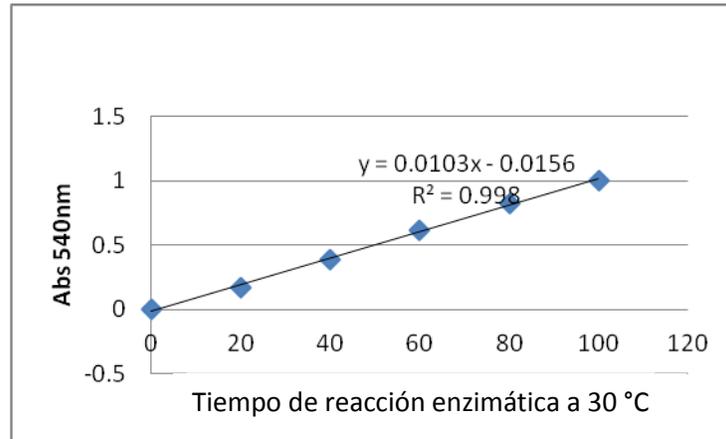


Figura 13. Medición de actividad enzimática (Muestra I). Se presenta la evolución de la absorbancia con el tiempo de reacción, midiendo el ensayo con DNS en condiciones clásicas (5 minutos a ebullición).

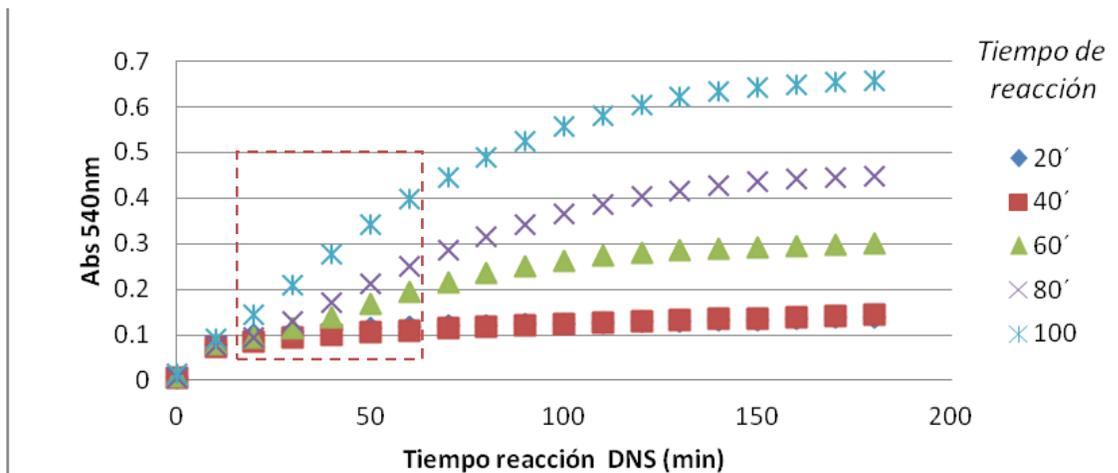


Figura 14. Cinética de la reacción del ensayo DNS/reductores (CBT) de la muestra I

En la figura 14 podemos observar la evolución de la reacción a 45 °C entre el reactivo DNS y los reductores provenientes de las muestras tomadas a diferentes

tiempos de la reacción enzimática a (30 °C). Se observa que después de 120 minutos de reacción, la DO se estabiliza, indicando que prácticamente la totalidad de azúcares reductores generados por la enzima han reaccionado con el DNS. Sin embargo es importante notar que la DO al término de la reacción de DNS a 45 °C (~0.66) es menor comparada con la DO obtenida al hervir la muestra 5 minutos (1.00) en las condiciones clásicas (figura 13). Estos datos nos permiten determinar la actividad enzimática considerando las lecturas de absorbancia después de los 100 minutos de reacción con DNS (CBT).

Dentro de la figura 14 se encuadran en rojo los puntos que van de 20 a 60 minutos de reacción con DNS, y se amplifican en la figura 15 en una gráfica logarítmica.

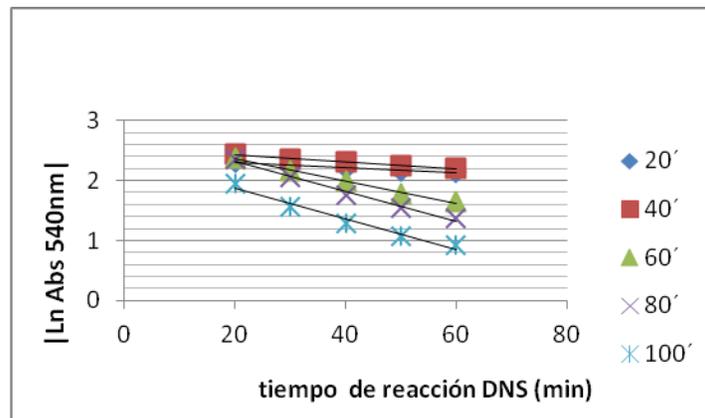


Figura 15. Representación de la zona inicial de reacción de la figura 14 en forma logarítmica.

Al obtener el logaritmo natural de la DO respecto al tiempo de la parte inicial de las reacciones se analiza la posibilidad de que la reacción sea de primer orden. Sin embargo en la figura 15, este fenómeno no se aprecia claramente, ya que los datos obtenidos a cortos tiempos de reacción y baja concentración enzimática, tienen pendientes que difieren del resto.

Tabla 12. Valores de pendientes de la figura 15.

Reacción DNS	
tiempo (min)	Pendiente
20	-0.0041
40	-0.0059
60	-0.0184
80	-0.0247
100	-0.0254

En lo que respecta a la Muestra VII, la de mayor actividad, la medición de actividad en las condiciones estándar se muestra primeramente en la figura 16. Se observa el incremento de DO con el tiempo de incubación de la reacción enzimática a 30 °C, de la cual se tomaron muestras cada 20 minutos.

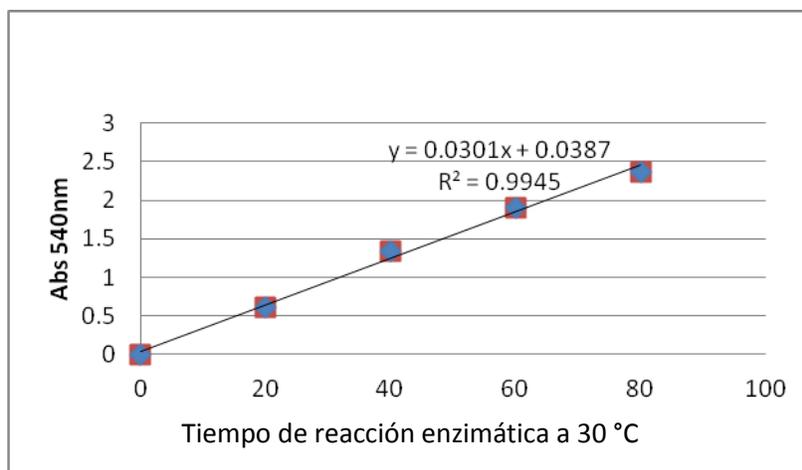


Figura 16. Medición de actividad enzimática (muestra VII). Se presenta la evolución de la absorbancia con el tiempo de reacción, midiendo el ensayo en condiciones estándar de la reacción de DNS (5 minutos a ebullición)

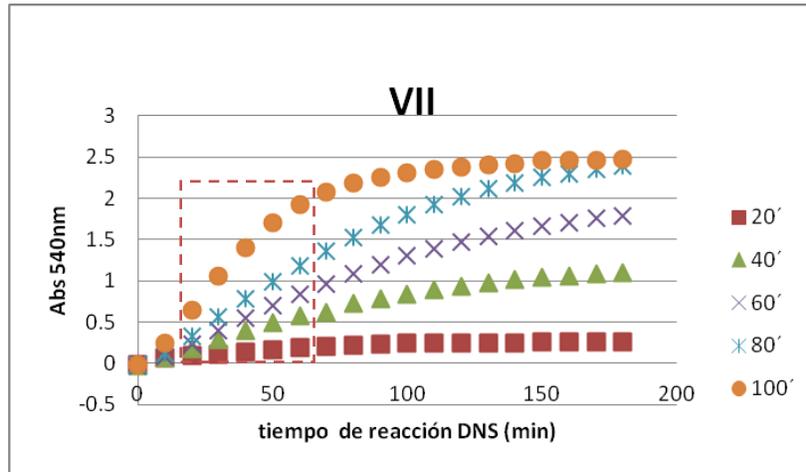


Figura 17. Cinética enzimática de la reacción del ensayo DNS/reductores (CBT) de la muestra VII.

A diferencia de la figura 14, en la figura 17, si se alcanza la misma DO al término de la reacción de DNS a 45 °C que al hervir la muestra 5 minutos (figura 16) en las condiciones estándar. Sin duda esto es debido a la mayor actividad de la muestra VII con respecto a la muestra I. En la figura 17, de igual forma, se marca en un cuadro rojo los puntos que van de 20 a 60 minutos de reacción con DNS ya que corresponden a la parte lineal de la cinética y se presentan en forma logarítmica en la figura 18.

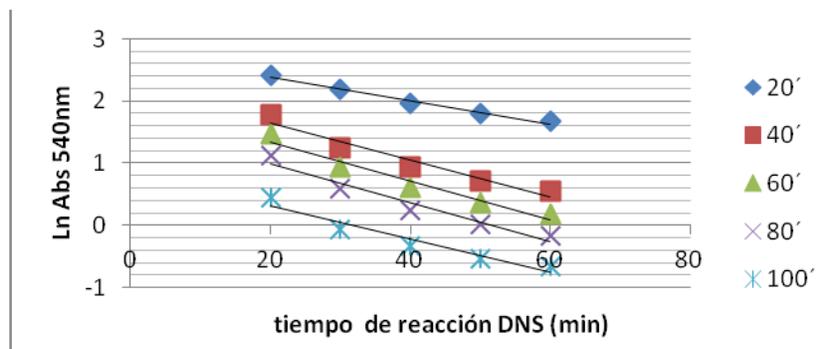


Figura 18. Logaritmo natural de la absorbancia en la parte lineal de la reacción con DNS de muestra VII

Tabla 13. Valores de pendientes de la figura 18

Reacción DNS	
tiempo (min)	Pendiente (m)
20	-0.0188
40	-0.0297
60	-0.0315
80	-0.0313
100	-0.0266

A diferencia de lo observado en la figura 15, en la figura 18 se observa claramente que la reacción entre el DNS y los azúcares reductores es de primer orden ya que la gráfica que describe la variación logarítmica de la DO con respecto al tiempo es lineal. Esto permite concluir que si bien se tienen dos reactivos (el DNS y el azúcar reductor), el DNS se encuentra en exceso por lo que su concentración se puede considerar constante durante la reacción. Así, la reacción es de primer orden con respecto al azúcar reductor o de pseudoprimer orden general. Con los

resultados realizados se plantea establecer las condiciones a baja temperatura para la medición de azúcares reductores por la técnica de DNS.

Se procedió entonces a medir la actividad enzimática de las 7 soluciones de enzima descritas en la Tabla 11, tomando muestras a diferentes tiempos de reacción enzimática que van de 20 a 100 minutos y llevando a cabo la reacción de ensayo con DNS durante 160 minutos. Los resultados se reportan en la figura 19.

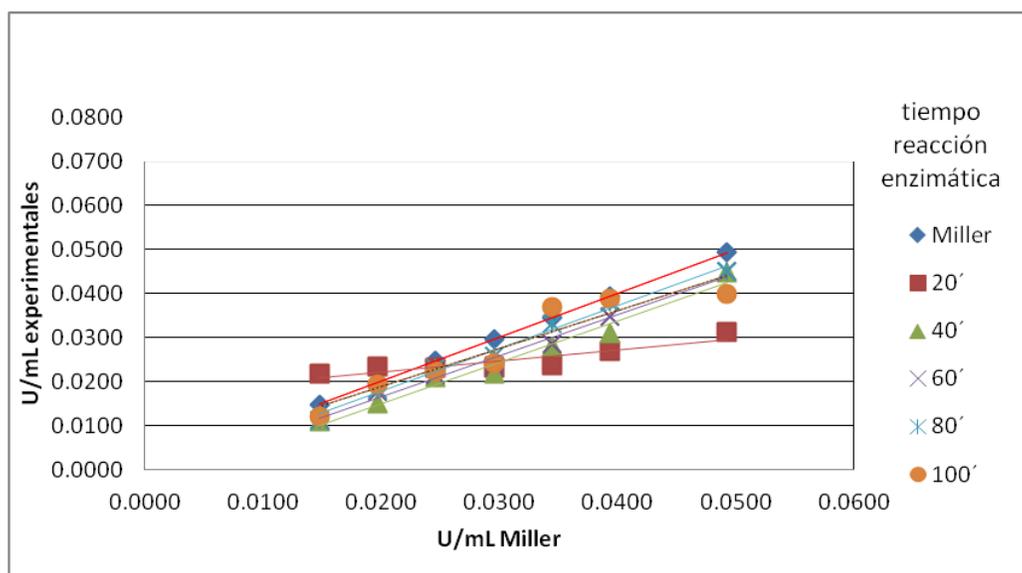


Figura 19. Unidades de actividad enzimática obtenidas experimentalmente tanto por el método de Miller (abscisas y recta azul) como a las condiciones de baja temperatura (CBT) a diferentes tiempos de reacción enzimática. El valor de absorbancia asignado a cada tiempo de reacción se seleccionó considerando el valor promedio de absorbancia alcanzada después de 120-160 minutos del ensayo DNS/reductores.

Los resultados de actividad enzimática deberían ser los mismos independientemente del tiempo de reacción que se seleccione para medir la velocidad de reacción, siempre y cuando el ensayo se encuentre dentro de la etapa en la que la velocidad de reacción es lineal. Así, todas las líneas de la figura 19 deberían tener la misma pendiente. En la tabla 14 se muestra la correlación lineal de dichas rectas.

Tabla 14. Pendientes y ordenadas al origen de los diferentes tiempos de reacción enzimática de la figura 19.

(min)	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)
Miller teórica	1	0
20	0.2452	0.0173
40	0.9342	-0.0037
60	0.9394	-0.0024
80	0.9782	-0.0019
100	0.8669	0.0014

Los resultados obtenidos muestran que 20 minutos se considera un tiempo de reacción muy corto como para hacer una medición confiable, por lo que debe descartarse. Sin embargo en la tabla 8 se observa que a partir de los 40 minutos de reacción con DNS, el valor de la regresión lineal obtenidas de las rectas tienen una pendiente prácticamente constante que dan lugar a una medición de unidades de actividad muy similar a las unidades obtenidas por el método de Miller, (1959).

En la figura 20 se muestra la actividad enzimática (U/mL) considerando solo un punto de la reacción con DNS, comparada con las unidades obtenidas por el método de Miller.

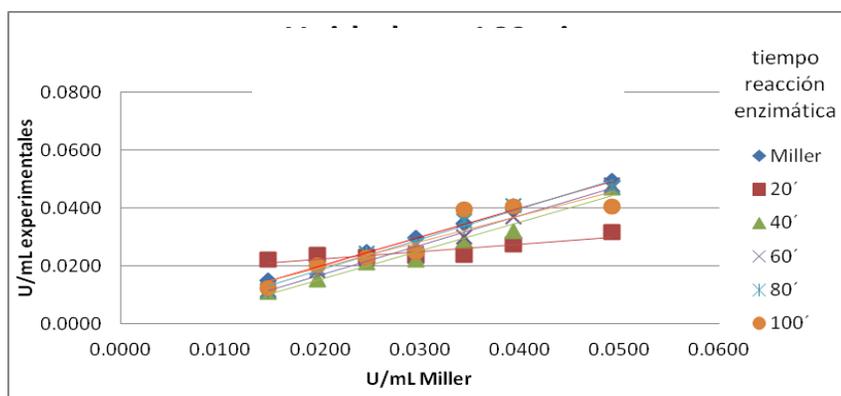


Figura 20. Unidades obtenidas con el método de Miller y CBT considerando 160 minutos de reacción con DNS a diferentes tiempos de reacción enzimática.

Las figuras 19 y 20, indican que por abajo del equivalente a 0.05 U/mL de actividad medida de forma convencional (CE), a tiempos tan cortos como 20 minutos de reacción enzimática los valores de actividad obtenidos mediante la técnica a baja temperatura resultan muy alejados de los obtenidos en CE. Sin embargo, a partir de 40 minutos de reacción enzimática la actividad calculada a CBT es muy similar a la actividad real, (tabla 8 y 9).

Tabla 15. Pendientes y ordenadas al origen de los diferentes tiempos de reacción enzimática de la figura 20.

(min)	Pendiente m	Ordenada al origen b
Miller teórica	1	0
20	0.2489	0.0175
40	0.9904	-0.0046
60	1.0176	-0.0034
80	1.0497	-0.0023
100	0.8915	0.0017

Recapitulando, en las figuras 19 y 20 se observan los valores de actividad obtenidos empleando diferentes criterios: considerando los últimos valores del ensayo con DNS que va de 120-160 minutos tomando como curva estándar el

valor promedio (pendiente) de las curvas patrón de 120-160 minutos o tomando 160 minutos, y utilizando el valor de la curva patrón del tiempo correspondiente (tabla 10).

Mediante un análisis estadístico que se incluye en el anexo A se encontró que al comparar entre si los valores obtenidos bajo las diferentes condiciones de reacción, existe una diferencia estadísticamente significativa. Es por ello que se realizó un estudio estadístico comparando cada una de las condiciones de baja temperatura con el método convencional. De esta forma se pudo apreciar que a partir de 40 minutos de reacción enzimática y más de 120 minutos de reacción con DNS a 45 °C, no existe diferencia significativa respecto a las condiciones convencionales establecidas por Miller, (1959).

Con ello es posible concluir que las mejores condiciones establecidas para poder medir actividades tan bajas como 0.015 U/mL, a baja temperatura requieren de 80 minutos de reacción enzimática y 160 minutos de reacción con DNS. En estas condiciones no existe diferencia estadísticamente significativa entre el ensayo convencional a temperatura de ebullición y el ensayo en condiciones de baja temperatura, con un 99.5% de confianza.

6.1.3 Conclusiones sobre la viabilidad de un ensayo de azúcares reductores en condiciones de baja temperatura

Se realizaron modificaciones al método original de Miller. Con estas nuevas condiciones se definieron condiciones que permiten medir azúcares reductores en un volumen menor, pero sobre todo se demostró que es posible reducir la temperatura del ensayo de 100 °C a 45 °C.

Al disminuir la temperatura, es necesario modificar las condiciones de reacción, definiendo el tiempo de reacción necesario para alcanzar y determinar las pequeñas cantidades de azúcares reductores equivalentes a un nivel mínimo de actividad de 0.015U/mL. Se estableció que con 80 minutos de reacción enzimática

y 160 minutos de reacción de la muestra con DNS a 45 °C no existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05$) entre la actividad medida mediante el método original de Miller y el método definido a las nuevas CBT establecidas.

Para efectos de screening, es necesario señalar que para niveles tan bajos de actividad, se encontró que se necesitan tiempos de reacción enzimática mayores a 20 minutos para obtener valores confiables de actividad enzimática; sin embargo las muestras tomadas a los 80 minutos de reacción generaron los datos de actividad más cercano al dato obtenido en las condiciones estándar. Se concluyó además que la reacción enzimática es de pseudo-primer orden.

Con estas condiciones de temperatura es posible cuantificar actividad enzimática en un instrumento automatizado capaz de analizar muestras en forma masiva.

6.2 Segunda parte

Selección de mutantes mediante el fenotipo derivado de la síntesis de polímero

6.2.1 Selección de cepas

Tomando en cuenta los antecedentes en la literatura de selección de cepas mutantes a partir de su fenotipo, decidimos implementar (o desarrollar) una metodología adaptada específicamente para la inulosacarasa IsIA4 que es capaz de sintetizar el polímero inulina a partir de sacarosa. Considerando que la mayor parte de las cepas existentes de *E. coli* no son capaces de metabolizar sacarosa, se buscaron cepas que si lo fueran ya que este es un requisito absoluto para el ensayo, por el ser el único sustrato de la enzima. Se realizaron pruebas de crecimiento de cinco diferentes cepas, proporcionadas por la Dra. Gloria Saab y el Dr. Alfredo Martínez del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se incubaron en medio mínimo M9 (líquido y sólido) con 5% de sacarosa como única fuente de

carbono durante 96 horas a 30 °C obteniéndose los resultados que se describen en la tabla 16.

Tabla 16. Cepas de *E. coli* incubadas en medio mínimo con sacarosa al 5%.

Cepa	Crecimiento en M9 con 5% de sacarosa
<i>E. coli</i> BL-21	-
<i>E. coli</i> DH5 α	-
<i>E. coli</i> JM101	-
<i>E. coli</i> XL1-Blue	-
<i>E. coli</i> C	+

Como puede constatarse en la tabla 16, de las 5 cepas de *E. coli* que se analizaron, solo *E. coli* C, fue capaz de crecer en medio mínimo líquido con sacarosa al 5% como única fuente de carbono. De esta manera se pudo disponer de una cepa que además de crecer, pudiera transformar la sacarosa que usa como fuente de carbono, en polímero. Posteriormente se transformó *E. coli* C con diferentes plásmidos, incluyendo genes que codifican para FTF productoras de polímero con la finalidad de observar el cambio en el fenotipo de la colonia y saber cómo se vería una cepa con el gene de la enzima silvestre y un gen con mayor actividad. En las figura 21 se presenta *E. coli* C transformada con el vector *pBAD*, la cual no tiene la capacidad de producir polímero de fructosa. Mientras que en la figura 22 se observa a *E. coli* C transformada con el vector *pBAD-IsIA3* incluyendo el gen que codifica para la enzima IsIA3, capaz de producir polímero de inulina.

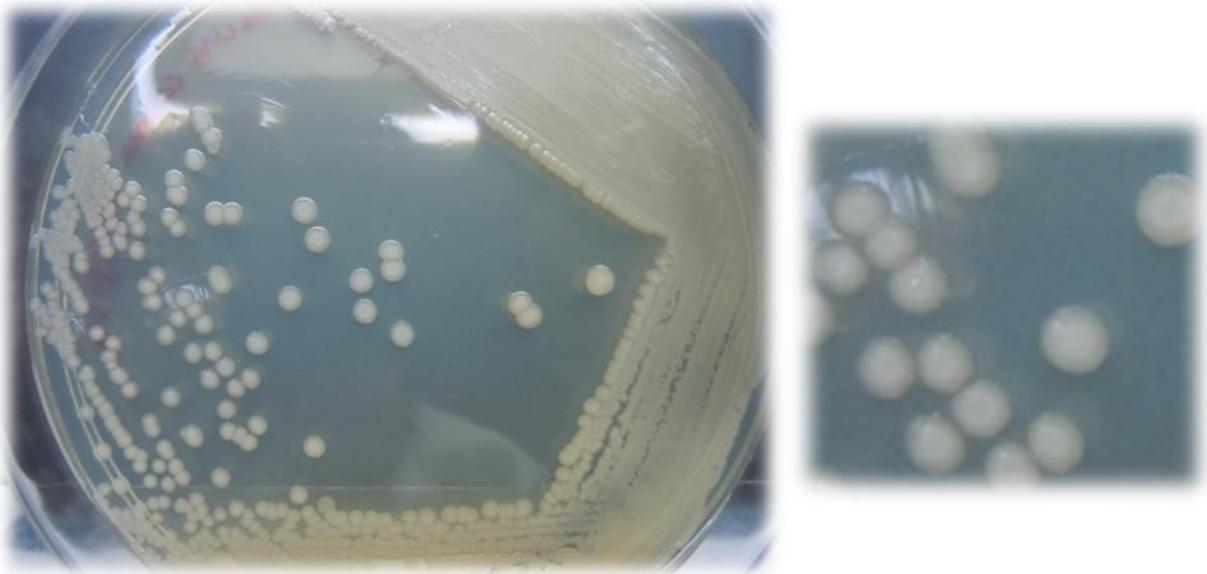


Figura 21. *E. coli C* pBAD usada como control, pues el plásmido no incluye ningún gen que codifique para una enzima con actividad FTF. Se observan colonias bien definidas sin producción de polímero.

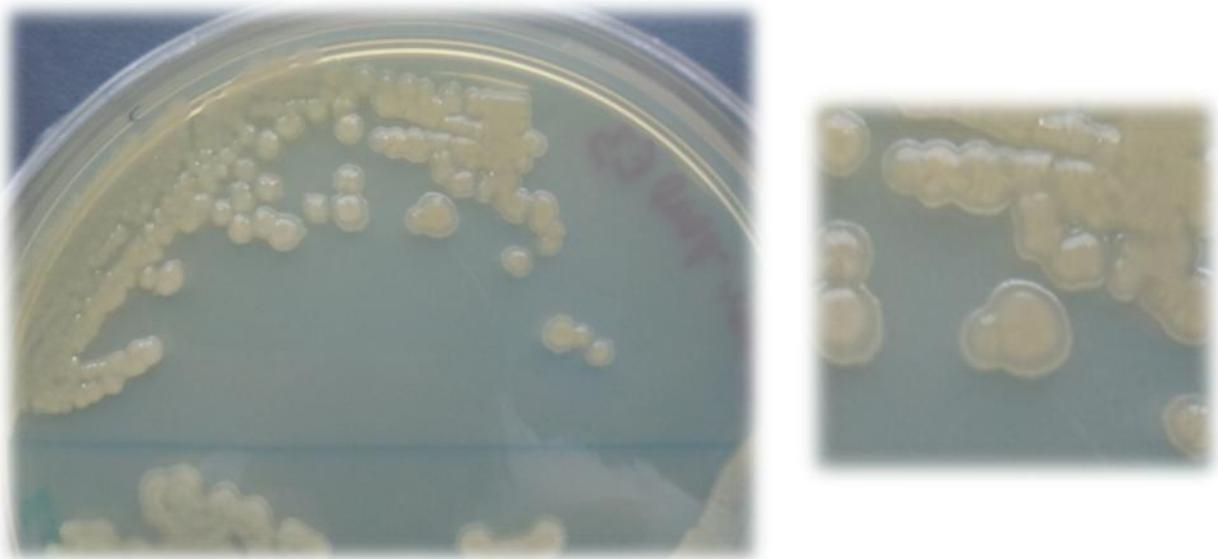


Figura 22. *E. coli C* transformada con el plásmido pBAD-IsIA3 que contiene el gen de la IsIA3 (Véase la sección 1.1.6). Se observan colonias mucosas bien definidas con un halo alrededor, debido a que la enzima que codifica el gen IsIA3 produce polímero de alto peso molecular.

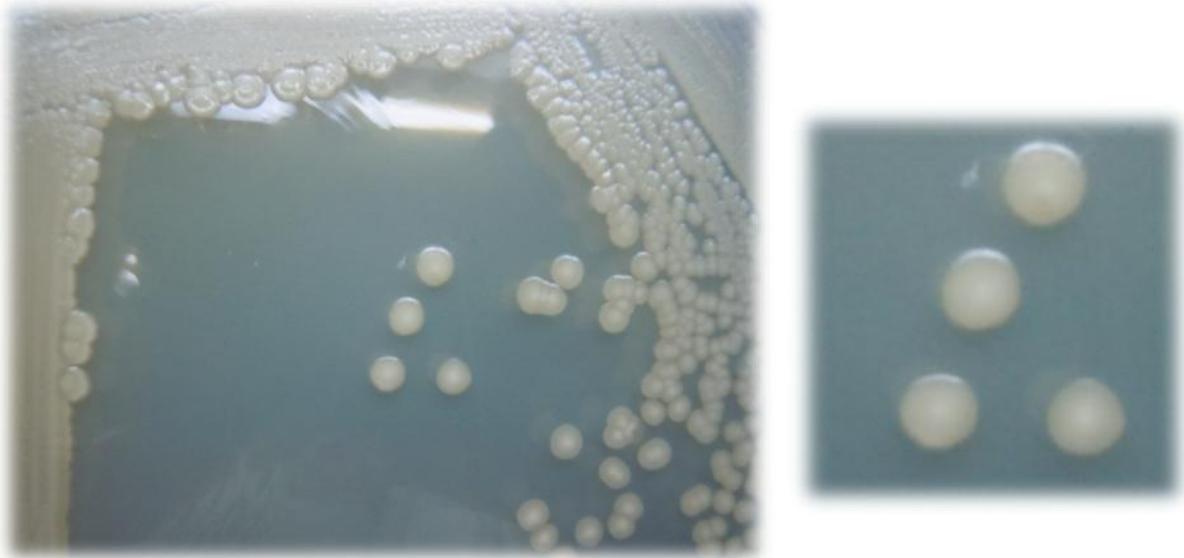


Figura 23. *E. coli C pet 28 b*, usada como control, ya que el plásmido no incluye ningún gen que codifique para una enzima con actividad FTF. Se observan colonias bien definidas sin producción de polímero.

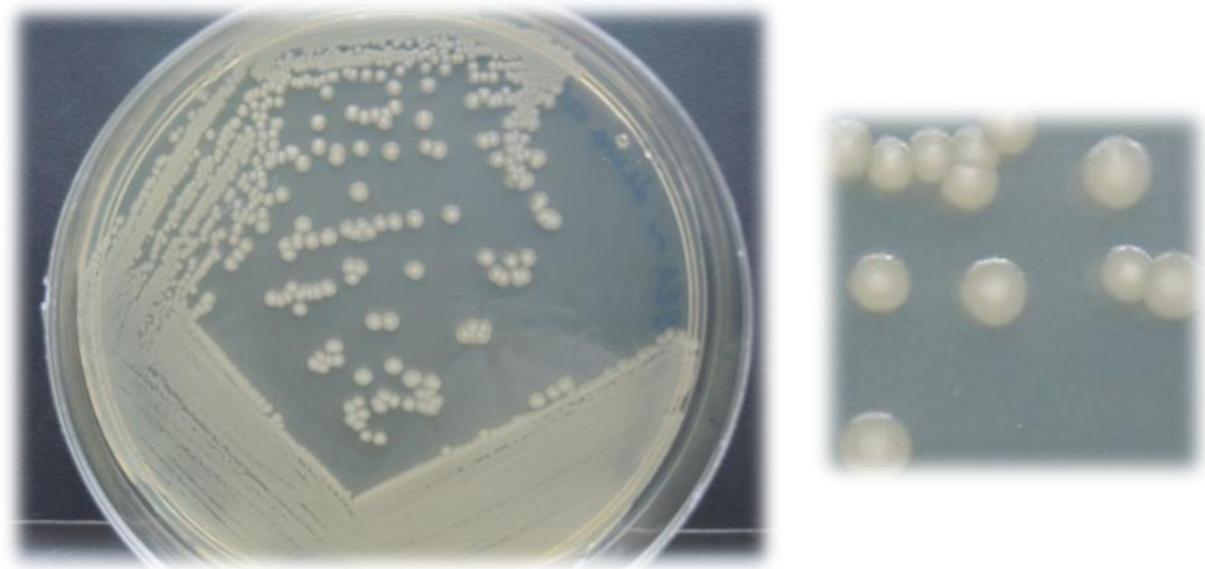


Figura 24. *E. coli C pet 28 b IsIA4*. Se observan colonias poco mucosas bien definidas debido a la capacidad de la enzima IsIA4 para la producción de polímero de fructosa de alto peso molecular.

Con base en los experimentos anteriores se demuestra que el fenotipo que confiere a *E.coli* la actividad FTF, en este caso las versiones *IslA3* y *IslA4*, muestran un fenotipo mucoso que claramente las distingue de las mismas cepas en las que no existe esta actividad (figuras 21 y 23). Se puede además observar que las cepas de *E.coli C pet 28 b-IslA4* tienen un fenotipo claramente menos viscoso que las cepas *E. coli C pBAD-IslA3* ya que esta enzima, produce mayor cantidad de polímero de fructosa. Estos resultados, son similares a los reportados en la literatura para la identificación de cepas con mayor actividad de una enzima tipo glucosiltransferasa Bart *et al.* (2004). Por ello es posible suponer que el fenotipo viscoso puede ligarse al nivel de actividad, es decir, mientras más viscosa una colonia, mayor nivel de actividad está presente en ella. Así, partiendo de una enzima poco o medianamente activa, o bien de un sistema de baja expresión del gen, es posible identificar mutantes que, como consecuencia de la mutación, presenten una mayor actividad hacia la síntesis del polímero. Esto tiene una ventaja sobre la identificación de mutantes mediante actividad medida por liberación de poder reductor, ya que esta no discrimina entre aumentos de actividad por una mayor hidrólisis de la sacarosa o una mayor síntesis de polímero.

6.2.2 Construcción de librerías mutagénicas

6.2.2.1 PCR *error-prone*

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar estrategias que permitan seleccionar mutantes del gen *IslA4* generadas por evolución dirigida que den lugar a enzimas con mayor actividad inulosacarasa. Se lograron establecer condiciones para cuantificar actividad inulosacarasa en un instrumento automatizado capaz de analizar muestras en forma masiva. Por otro lado, también se establecieron las condiciones para seleccionar clonas por su habilidad de crecer en un medio selectivo que permite emplearla para la selección de enzimas

FTFs, a través del fenotipo adquirido cuando la enzima produce un polímero a partir de sacarosa.

Al mismo tiempo, se planteó establecer las condiciones necesarias para la producción de librerías mutagénicas mediante técnicas de evolución dirigida., por lo tanto se procedió a construir librerías mutagénicas empleando la metodología PCR *error-prone*. Se construyeron dos librerías una con Mn y otra sin Mn, en las condiciones descritas en métodos y materiales. En la figura 24 se muestran los productos de PCR en los tamaños esperados, sin embargo se observa que el manganeso afecta la síntesis de los productos, ya que en presencia de este se obtiene menor cantidad de producto de PCR que en ausencia del mismo. Este efecto se observa también en los productos de PCR ya purificados (figura 26).

Los productos de PCR así obtenidos se clonaron en el vector pet28b, transformados en células de *E. coli TG1* y crecidas en medio sólido LB con kanamicina 50µg/ml tal y como se indica en la metodología reportada en la sección de métodos y materiales.

A pesar de ser una técnica muy común (PCR *error-prone*) por diversas razones resultó muy largo y laborioso la construcción de la librería mutagénica ya que existen pasos cruciales experimentalmente hablando que deben realizarse con una buena técnica además, los reactivos (enzimas) deben de manejarse en condiciones óptimas.

Tras un sin número de intentos y cambios en las condiciones de reacción se logró obtener la reacción de PCR, purificación, digestión y ligación para finalmente lograr la construcción de la librería mutagénica.

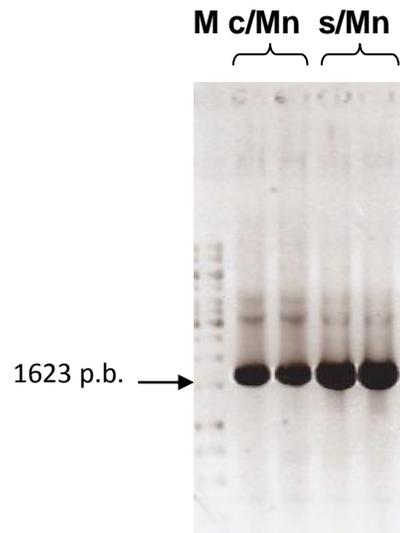


Figura 25. Gel de agarosa al 1%. M=Marcado; PCR (5 μ L) sin purificar con y sin Mn respectivamente.

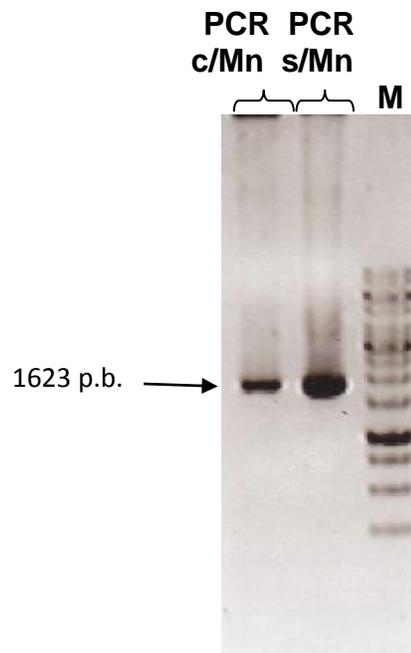


Figura 26. Gel de agarosa al 1%. M=Marcador, 5 μ L de cada PCR purificadas por columna con el Kit Gene Jet extraction (Fermentas).

6.2.3 Secuenciación de librerías mutagénicas

De las dos librerías construidas se seleccionaron 5 colonias al azar de cada, se crecieron en medio LB con kanamicina se extrajo el plásmido para finalmente secuenciar el gen *IslA4*. La librería sin manganeso tuvo una tasa de mutagenicidad del 0.08%, es decir prácticamente un cambio de nucleótido por cada 1623 pares de bases del gen *IslA4*. Por otro lado la librería construida en presencia de manganeso, la tasa de mutagenicidad fue de 0.5% es decir, alrededor de 8 cambios de base por cada gen de la *IslA4*. De los cambios identificados mediante la secuencia, se encontraron mutaciones que codifican para aminoácidos diferentes como es el cambio de Asparagina a Histidina y de Fenilalanina a Serina.

Con estos resultados es posible concluir que se establecieron las condiciones para la obtención de librerías con diferentes tasas de mutagenicidad por medio de la técnica de PCR *error-prone*.

6.2.4 “Screening” de librerías mutagénicas

A partir de las librerías obtenidas en *E.coli TG1*, se purificaron los plásmidos y se transformaron en *E. coli C*, como se especifica en la sección de métodos y materiales. Las librerías mutagénicas se platearon en cajas *petri* de 25 x 25 cm con medio M9 con 5% de sacarosa como única fuente de carbono, realizando las diluciones correspondientes para obtener alrededor de 2,500 colonias por caja, con la finalidad de observar mayor cantidad de clonas y en consecuencia incrementar la posibilidad de encontrar mutantes mucoides. Se platearon 5 cajas de cada librería, es decir, las colonias analizadas de cada librería fueron de 1.25×10^4 aproximadamente.



Figura 27. Librería mutagénica en medio mínimo con sacarosa al 5% como única fuente de carbono (30 °C / 120h)

De aproximadamente 25 mil colonias plateadas en medio mínimo 8 mutantes presentaron un fenotipo viscoso notablemente mayor, como se observa en la figura 31.

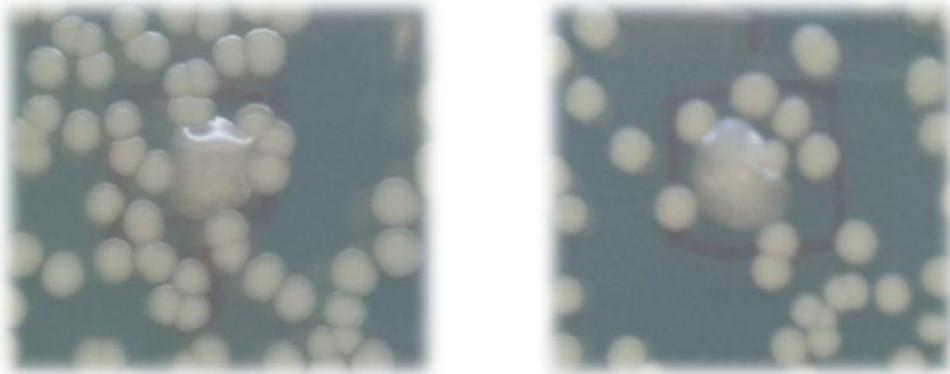


Figura 28. Obtención de mutantes con un fenotipo viscoso.

Las 8 mutantes obtenidas se resembraron en cajas petri con el mismo medio, para observar si el fenotipo viscoso se conservaba.

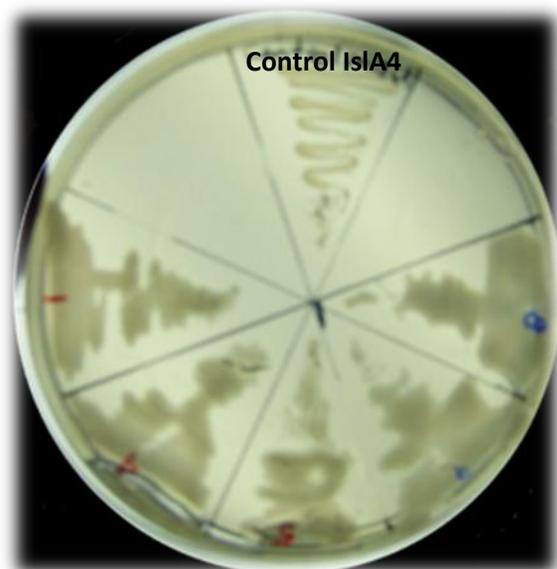


Figura 29. Mutantes de *IslA4* obtenidas en los bancos de alta y baja mutagenicidad seleccionadas mediante el fenotipo viscoso, aquí comparadas con *IslA4* como control.

En la primera resiembra de las mutantes el fenotipo viscoso se conservó. Posteriormente las cepas seleccionadas se sembraron nuevamente en cajas con medio LB kanamicina 50 mg/mL, ya que es un medio con alto contenido de nutrimentos para la célula.

De las mutantes seleccionadas, se extrajo plásmido. Se transformaron nuevamente células competentes de *E. coli* C, con los diferentes plásmidos y se crecieron en medio mínimo con sacarosa al 5% a 30 °C-120 horas. Sin embargo, en esta ocasión el fenotipo ya no se repitió, probablemente debido a que en este tipo de ensayos existen mutaciones muy inestables provocando que no se repitan en siguientes generaciones.

Por último, las 8 mutantes seleccionadas se crecieron en medio LB líquido (con kanamicina) a 37 °C, 200rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6. Posteriormente se adicionó IPTG a una concentración final de 0.2mM, se incubó el

cultivo durante 4 horas a 22 °C, 200rpm. Las células se cosecharon como se indica en la sección de materiales y métodos.

La actividad de las mutantes fue determinada con el método de DNS condiciones estándar, cuantificando los azúcares reductores liberados. Sin embargo las mutantes seleccionadas presentaron actividades iguales y/o menores que la IsIA4.

7.0 Conclusiones

- Se desarrollaron dos herramientas que permiten la selección de enzimas sobre productoras de actividad FTF: una a través de un ensayo colorimétrico de actividad de baja temperatura, adaptable a un sistema automatizado y otro sistema de selección basado en el fenotipo de *E. coli* conteniendo la actividad FTF, lo que permite una selección visual.
- Se modificaron las condiciones de reacción del ensayo de DNS para realizar la reacción colorimétrica en un sistema automatizado a 45 °C.
- La cepa *E. coli* C es capaz de crecer en medio mínimo con sacarosa al 5% como única fuente de carbono, lo que permite emplearla para la selección de enzimas FTFs a través del fenotipo adquirido cuando se transforman con un gen que codifica para una enzima que produce un polímero a partir de sacarosa.
- Se establecieron las condiciones de reacción para PCR *error-prone* de baja y alta mutagenicidad.
- Se lograron obtener todas las condiciones necesarias (purificaciones, digestiones, ligaciones) para la generación de dos librerías mutagénicas en *E. coli* C de aproximadamente 1.25×10^4 cada una.
- Se adaptó un método de screening en *medio sólido* para la selección de cepas sobre-productoras de polímero para la enzima IsIA4 de *Leuconostoc citreum*.
- De los bancos generados, se obtuvieron ocho mutantes con mayor producción de polímero, sin embargo al transformar nuevamente células de *E. coli* C con el plásmido de dichas cepas no se repitió el fenotipo viscoso.
- Las mutantes seleccionadas presentaron igual actividad enzimática comparada con IsIAE4.

8.0 Perspectivas

- Con base en las condiciones establecidas en éste trabajo, realizar nuevas rondas de PCR *error-prone* para la construcción de nuevas librerías mutagénicas.
- Seleccionar clonas sobre-productoras de polímero de inulina mediante el fenotipo mucosido característico de las colonias.
- Crecer las colonias mucosidas y analizar actividad mediante el ensayo colorimétrico de baja temperatura, adaptable a un sistema automatizado desarrollado en este trabajo así como purificar y caracterizar las enzimas mutantes sobre-productoras de polímero.
- Seleccionar la(s) mutante(s) más adecuada(s) para realizar la mutación específica S425A y determinar si se genera un cambio en la especificidad hacia la eficiente producción de FOS.

9.0 Referencias

1. **Antosová M, Polakovic M** (2001) Fructosyltransferases: theenzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chem Pap* 55:350–358
2. **Arnold, F. H.** (1988) Protein Design for Non-Aqueous Solvents. *Protein Eng.* 2:21-25
3. **Arnold, F. H.** (1998) When blind is better: Protein design by evolution. *Nature Biotechnology* 16:617-618
4. **Arnold, F. H. y Volkov, A. A.** (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin.Chem. Biol.* 3:54-59
5. **Bart A. van der Veen**, Gabrielle Potocki-Véronèse, Cécile Albenne, Gilles Joucla, Pierre Monsan, Magali Remaud-Simeon **(2004)** Combinational engineering to enhance amylosucrase performance: construction, selection, and screening of variant libraries for increased activity. *FEBS Letters* 91-97.
6. **Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., y Arnold, F. H.**
(2003b) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:987-995
7. **Cadwell RC, Joyce GF** (1992). “Randomization of genes by PCR mutagenesis”. *PCR Method Applic.* 2: 28-33.
8. **Cañas Portilla, Ana Isabel.** (2009). Diseño de nuevos sistemas de Lacasa-mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida. Tesis Doctoral en Ciencias Ambientales, Universidad de Alcalá.
9. **Chen WC, Liu CH** (1996) Production of b-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme Microb Technol* 18:153–160

10. **Chen, C. K. J., Shokhireva, T. K., Berry, R. E., Zhang, H. J., y Walker, F. A.** (2008) The effect of mutation of F87 on the properties of CYP102A1-CYP4C7 chimeras: altered regiospecificity and substrate selectivity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13:813-824
11. **Chien CS, Lee WC, Lin TJ** (2001) Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 29:252–257
12. **Cirino, P. C., Mayer, K. M., y Umeno, D.** (2003) Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol Biol* 231:3-9
13. **Collins MD, Gibson GR.** (1999) Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for the nutritional modulation of microbial ecology. *Am J Clin Nutr.*;69:1052s–7s.
14. **Conway P.L., Gibson G. R., Macfarlane G, T.,** (1995) Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. *Microbial ecology of the human large intestine* FL: CRC Press; p. 1–24.
15. **Corrigan, A. J. & Robyt, J. F.** (1979) Nature of the fructan of *Streptococcus mutans* OMZ 176, *Infection and Immunity.* 26, 387-389.
16. **Cuervo R, Guilarte B, Juárez A, Martínez J** (2004) Production of fructooligosaccharides by b-fructofuranosidase from *Aspergillus sp.* 27H. *J Chem Technol Biotechnol* 79:268–272.
17. **Cummings JH, Macfarlane GT** (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon: a review. *J Appl Bacteriol*;70:443–59.
18. **Darwin, C.** (1859) The origin of species. London, John Murray; Albemarle Street

19. **Del Moral Ventura, Sandra.** (2008). Función de las regiones adicionales de la inulosacarasa (IsIA) de *Leuconostoc citrum* CW28. Tesis Doctoral. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
20. **Doelle, H. W., Kirk, L., Crittenden, R., Toh, H. & Doelle, M. B.** (1993) *Zymomonas mobilis*. Science and industrial application, *Critical Reviews in Biotechnology*. 13, 57-98.
21. **Dorta C, Cruz R, Neto PO, Moura DJC** (2006) Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:1003–1009
22. **D. Voet, J.G. Voet y C.W. Pratt.** Fundamentals of Biochemistry. Wiley, 2002.
23. **Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA.** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308:1635–8.
24. **Eckert, K. A. y Kunkel, T. A.** (1990) High Fidelity Dna-Synthesis by the Thermus-Aquaticus Dna-Polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18:3739-3744
25. **Farinas, E. T., Bulter, T., y Arnold, F. H.** (2001) Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:545-551
26. **Franck, A.** (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition*. 87, S287-S291.
27. **Funane, K., Ookuta, T., and Kobayashi, M.,** (1998). Glucan binding regions of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62 (1): 123-127.

28. **Gibson GR & Roberfroid MB** (1995) Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401–1412.
29. **Gibson GR, Rastall RA**, (2006) Prebiotics: development and application. *Chichester: John Wiley & Sons*.
30. **Goddard, J. P. y Reymond, J. L.** (2004) Enzyme assays for high-throughput screening. *Current Opinion in Biotechnology* 15:314-322
31. **Guigoz Y, Rochat F, Perruisseau-Carrier G, Rochat I, Schiffrin EJ.** (2002) Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutr Res.*2002;22:3–25.
32. **Hall BG** (1999) “Toward an understanding of evolutionary potential”. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 1-6.
33. **Harmsen HJM, Raangs GC, Franks AH, Wildeboer-Veloo CM, Welling GW.** (2002) The effect of the prebiotic inulin and the probiotic *Bifidobacterium longum* on the fecal microflora of healthy volunteers measured by FISH and DGGE. *Microb Ecol Health Dis.* 2002;14:211–9.
34. **Harris JL, Craik CS** (1998). Engineering enzymes specificity”. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 127-132.
35. **Hendry, G & RK., W.** (1993). The origin, distribution and evolutionary significance of fructans, *Science and Technology of Fructans*.pp. 119-139. CRC Press.
36. **Hernandez. L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit Glatron, M. F. & Chambert. R.** (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane, *Biochemical Journal.* 309, 113-118.
37. **Hincha, D. K. Hellwege, E. M., Heyer A. G. & Crowe, J. H.** (2000) Plant fructans stabilize phosphatidylcholine

- liposomes during freeze-drying, *European Journal of Biochemistry*. 267, 535-540.
38. **Iffland, A., Tafelmeyer, P., Saudan, C., y Johnsson, K.** (2000) Directed molecular evolution of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 39:10790-10798
39. **Joo, H., Lin, Z. L., y Arnold, F. H.** (1999) Laboratory evolution of peroxidemediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* 399:670-673
40. **Jung KH, Yun WJ, Kang KR, Lim JY, Lee JH** (1989) Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microb Technol* 11:491–494
41. **Katapodis P, Kalogeris E, Kekos D, Macris BJ** (2004) Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:378–382
42. **Koepsell, H., Tsuchiya, H., Hellman, N., Kazenko, A., Hoffman, C., Sharpe, E., and Jackson, R.** (1953). Enzymatic synthesis of dextran. *J Biol Chem* 200: 793-801.
43. **Kolida, S., Tuohy, K. & Gibson, G. R.** (2002) Prebiotic effects of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition*. 87, S193-S197
44. **Kuchner O, Arnold F** (1997). “Directed evolution of enzymes catalysts”. *Trends Biotechnol.* 15: 523-530.
45. **Leung DW, Chen E, Goeddel DV** (1989). “A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction” *Technique*. 1: 11-15.
46. **Lewis, B. A., Cyr, M. J. S. & Smith, F.** (1967) The constitution of the fructana produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain C, *Carbohydrate Research*. 5, 194-201.

47. **Lin, L., Meng, X., Liu, P. F., Hong, Y. Z., Wu, G. B., Huang, X. L., Li, C. C., Dong, J. L., Xiao, L., y Liu, Z.** (2009) Improved catalytic efficiency of Endo-beta-1,4- glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:671-679
48. **Macfarlane GT, Gibson GR.** Metabolic activities of the normal colonic flora. In: Gibson SAW, editor. Human health: the contribution of microorganisms. London: Springer; 1994. p. 17–52.
49. **Mai, C., Schormann, W., Milstein, O., y Huttermann, A.** (2000) Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:510-514
50. **Marrs B, Delagraves S, Murphy D** (1999). “Novel approaches for discovering industrial enzymes”. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:241-245.
51. **Mills, D. R., Peterson, R. L., y Spiegelman, S.** (1967) An Extracellular Darwinian Experiment with A Self-Duplicating Nucleic Acid Molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58:217-&
52. **Mills, D., R. Peterson, S. Spiegelman, S.** An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58: 217-24 (1967).
53. **Milner J** (2000) Functional foods and nutraceuticals: the US perspective, 17th Ross Conference on Medical Issues. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, suppl, 16545–16595.
54. **Moore JC, Arnold FH** (1996). “Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents”. *Nat. Biotechnol.* 14: 458-467.
55. **Moore NCC, Yang L-P, Storm H, Oliva-Hemker M, Saavedra JM** (2003) Effects of fructo-oligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial. *Br J Nutr* 90:581–587
56. **Morales-Arrieta S, Rodríguez ME, Segovia L, López-Munguía A and Olvera-Carranza C.** 2006. Identification and Functional characterization of

- levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* 376, 59-67.
57. **Mordukhova, E. A., Lee, H. S., y Pan, J. G.** (2008) Improved Thermostability and Acetic Acid Tolerance of *Escherichia coli* via Directed Evolution of Homoserine o-Succinyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7660-7668
58. **Neylon C** (2004). "Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution". *Nucleic Acids Res.* **32**: S127-129.
59. **Nishisawa K, Nakajima M, Nabetani H** (2001) Kinetic study on transfructosylation by b-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for fructooligosaccharide production. *Food Sci Technol Res* 7:39–44
60. **Ortíz Soto, María Elena.** (2008). Obtención de biocatalizadores a partir de variantes de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* con nuevas propiedades de fructosilación. Tesis Doctoral. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
61. **Osman, S.F., Fett, W. F. & Fishman, M. L.** (1986) Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*, *Journal of Bacteriology.* 166, 66-71.
62. **Raillard, S., Krebber, A., Chen, Y. C., Ness, J. E., Bermudez, E., Trinidad, R., Fullem, R., Davis, C., Welch, M., Seffernick, J., Wackett, L. P., Stemmer, W. P. C., y Minshull, J.** (2001) Novel enzyme activities and functional plasticity revealed by recombining highly homologous enzymes. *Chemistry & Biology* 8:891-898
63. **Roberfroid MB & Slavin J** (2000) Nondigestible oligosaccharides. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 40, 461–480.

64. **Roberfroid M. B.**, (2002) Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition* 87, Suppl. 2, S139-S143
65. **Roberfroid M. B.**, (2007) Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients, *J. Nutr.* 137: 2493S-2502S.
66. **Salazar, O. y Sun, L.** (2003) Evaluating a screen and analysis of mutant libraries.
Arnold, F. H. and Georgiou, G. Directed enzyme evolution. Screening and selection methods 85-97 Totowa, New Jersey (EEUU), Humana Press
67. **Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG** (2005a) Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. *Process Biochem* 40:1085–1088
68. **Sofia Kolida and Glenn R. Gibson** (2007) Prebiotic Capacity of inulin-Type Fructans, *Journal of Nutrition.* 137:2503S-2506S.
69. Stemmer, W.P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10747-10751
Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. and Arnold, F.H. (1998) *Nat. Biotechnol.* 16, 258-261
70. **Stemmer, W. P. C.** (1994) Rapid Evolution of A Protein In-Vitro by Dna Shuffling. *Nature* 370:389-391
71. **Tanaka, T., Oi, S. & Yamamoto, T.**
(1980) The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase, *Journal of Biochemistry.* 87, 297-303.
72. **Uscanga Castillo P.** (2010). “Estudio sobre la producción e identificación de sustancias prebióticas en el pozol”. Tesis en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
73. **Vanesa Olivares-Illana, Agustín López-Munguía and Clarita Olvera** (2003) Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology.* Vol. 185, No. 12 p. 3606–3612

74. **Van Geel-Scutten, G. H., Faber, J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegthart. J. F. G. & Dijkhuzein, L.** (1999) Biochemical and structural characterization of the glucan and fructana exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild type strain and by mutant strains, *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3008-3014.
75. **Vijn, I. & Smeekens, S.** (1999) Fructan: More than reserve carbohydrate?, *Plant Physiology*. 120, 351-359.
76. **Williams, G. J., Nelson, A. S., y Berry, A.** (2004) Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61:3034-3046
77. **Wong, T. S., Zhurina, D., y Schwaneberg, U.** (2006) The diversity challenge in directed protein evolution. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:271-288
78. **Yuan, L., Kurek, I., English, J. and Keenan, R.** (2005) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69, 373–392.
79. **Yun JW** (1996) Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb Technol* 19:107–117
80. **Zhao, H., Moore, J. C., Volkov, A. A., y Arnold, F. H.** (1999) Method for optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Manual of industrial microbiology and biotechnology* :597-604 Washington (EEUU), ASM Press
81. **Zhao, H., Chockalingam, K., y Chen, Z.** (2002) Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 13:104-110

82. **Zumarraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Plow, F. J., Ballesteros, A., y Alcalde, M.** (2007) In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. *Chemistry & Biology* 14:1052-1064

9.1 Referencias cepas *

83. **Dower, W.; Miller, J. and C. Ragadale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*. 16: 6127-6145.
84. **Grant, S.G.N. et al.** (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4645-4649
PMID 2162051
85. http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes
86. **Maniatis, T.; Fritsch, E. and K. Sambrook.** 1982. Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*
87. **Messing, J. et al.** (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 309.
88. **Perera, J.; Tormo, A. y J. García.** 2002^a Ingeniería Genética. Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. *Vol I. Edit. Síntesis. Madrid. 527 pp.*
89. **Sambrook. J.; Frisch, E. and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2^oEdic. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
90. **Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.** (1985) *Gene* 33, 103.

Anexo A

Se decidió hacer un análisis estadístico para los datos de la figura 19 y 20 para determinar si existe diferencia significativa entre las diferentes condiciones y tiempos de reacción enzimática.

Tabla 16. Anova de los valores obtenidos en la figura 19 de actividad enzimática considerando el promedio de 120-160 minutos de reacción con DNS.

	SC	GL	CM	F experimental	F Tablas	Decisión
Modelo	0.004516	12	0.00037633	27.356472	2	H1
Tratamiento	0.000281	6	4.6844E-05	3.4051961	2.34	H1
Bloques	0.004235	6	0.00070582	51.3077479	2.34	H1
Error	0.000495	36	1.3757E-05			
Total	0.005011	48				

Tabla 17. Anova de los valores obtenidos en la figura 20 de actividad enzimática considerando 160 minutos de reacción con DNS.

FV	SC	GL	CM	F experimental	F tablas	Decisión
Modelo	0.00482	12	0.0004	24.9710	2	H1
Tratamiento	0.00024	6	4.0357E-05	2.50731	2.34	H1
Bloques	0.00458	6	0.0007	47.4348	2.34	H1
Error	0.0006	36	1.6096E-05			
Total	0.0054	48				

Donde:

H0: No hay evidencia suficiente para decir que existe diferencia significativa entre las muestras comparadas con un 99.5% de confianza.

H1: Hay evidencia suficiente para decir que existe diferencia significativa entre las muestras comparadas con un 99.5% de confianza.

El análisis de varianza indica que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Por consiguiente se realizó la prueba estadística de Duncan con un $\alpha=0.05$ para determinar que datos son estadísticamente diferentes, arrojando los siguientes resultados.

Tabla 18. Prueba estadística de Duncan $\alpha=0.05$ para los valores de actividad de diferentes condiciones, promedio 120-160 minutos de reacción DNS (figura 19) (M= Mille Teórico; CE=Condiciones estándar, 20, 40 60, 80 y 100 se refiere al tiempo en minutos de reacción enzimática).

Condiciones	Diferencia medias	Duncan Valor de tablas 0.004578
M VS C.E.	0.001	H0
M VS 20	0.0056	H1
M VS 40	0.0057	H1
M VS 60	0.0043	H0
M VS 80	0.0026	H0
M VS 100	0.0027	H0
CE VS 20	0.0066	H1
CE VS 40	0.0067	H1
CE VS 60	0.0053	H1
CE VS 80	0.0036	H0
CE VS 100	0.0037	H0

Si al hacer la diferencia de medias entre las diferentes condiciones, el valor es mayor de 0.004578, indica que existe diferencia significativa entre dichos métodos (H1). La prueba de Duncan indica que a tiempos de 20 y 40 minutos de reacción enzimática hay diferencia significativa al compararlo con el método de Miller y las CE, en éste último caso se incluye 60 minutos de reacción enzimática. En todos los demás casos no existe diferencia significativa (H0).

Tabla 19. Prueba estadística de Duncan $\alpha=0.05$ para los valores de actividad de diferentes condiciones a 160 minutos de reacción con DNS (figura 20) (M= Miller; CE=Condiciones estándar; 20, 40 60, 80 y 100 se refiere al tiempo de reacción enzimática).

Condiciones	Diferencia de medias	Duncan Valor de tablas 0.004952
M VS C.E.	0.001	H0
M VS 20	0.005301	H1
M VS 40	0.004939	H0
M VS 60	0.002907	H0
<u>M VS 80</u>	<u>0.000804</u>	<u>H0</u>
M VS 100	0.001633	H0
CE VS 20	0.006301	H1
CE VS 40	0.005939	H1
CE VS 60	0.003907	H0
<u>CE VS 80</u>	<u>0.001804</u>	<u>H0</u>

En éste caso la diferencia de medias debe ser menor a 0.00495 para que no exista diferencia significativa entre los tratamientos comparados. Con base en la tabla 13, Se observa H1 en las CE comparadas con 20 y 40 minutos de reacción enzimática. Así mismo existe diferencia significativa entre el método de Miller y 20 minutos. Para todas las demás comparaciones no existe diferencia significativa sin embargo al comparar Miller con 40 minutos de reacción enzimática, la prueba indica H0, sin embargo se observa que la diferencia de medias se encuentra prácticamente en el valor límite.

Al hacer un análisis en ambos casos para la determinación de actividad enzimática (promedio de 120-160 minutos y 160 minutos de reacción con DNS) se puede concluir tanto de manera gráfica como estadísticamente que las condiciones en las que se obtiene un valor de actividad de mayor similitud con el método de Miller y CE, son 80 minutos de incubación enzimática. En cuanto a la reacción con DNS,

se deben considerar los valores despues de los 120 minutos, se recomienda 160 minutos de reacción.

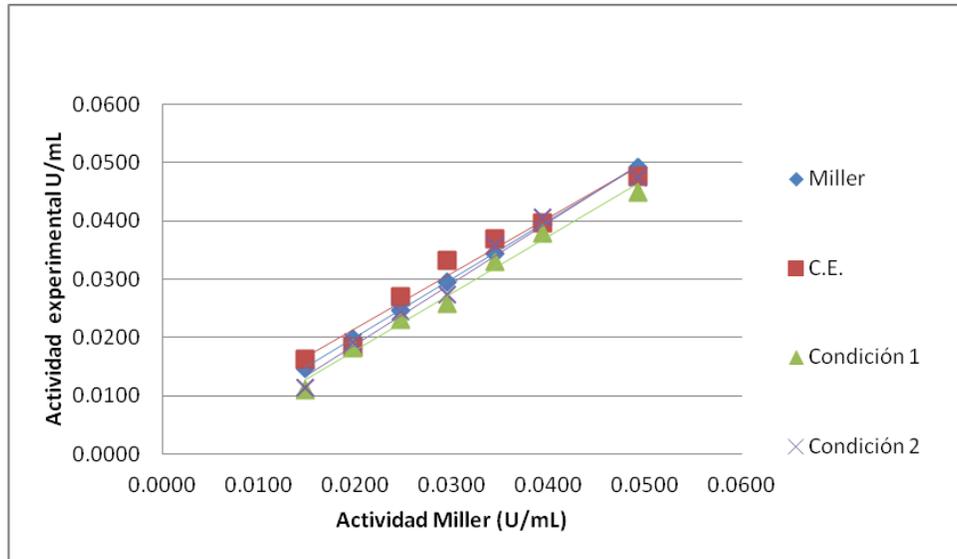


Figura 30. Unidades teóricas y experimentales a diferentes condiciones de reacción.

Condición 1= 80 minutos de reacción enzimática-30 °C/promedio120-160 minutos de reacción con DNS a 45 °C.

Condición 2 = 80 minutos de reacción enzimática-30 °C/160 minutos de reacción con DNS a 45 °C.

Tabla 20. Unidades/mL de las siete muestras de enzima analizadas.

	Miller	Condiciones Estándar	Condición 1	Condición 2
Muestra	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL
I	0.0148	0.01631	0.01109	0.01143
II	0.0197	0.01837	0.01826	0.01920
III	0.0246	0.02692	0.02316	0.02452
IV	0.0295	0.03326	0.02580	0.02746
V	0.0345	0.03690	0.03304	0.03571
VI	0.0394	0.03959	0.03787	0.04073
VII	0.0492	0.04767	0.04496	0.04743

La figura 21 y la tabla 20 muestran las condiciones 1 y 2 comparadas con el método de Miller y CE en las cuales no existe diferencia significativa al compararlas.